

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE AGROSILVO PASTORIL
ESCUELA ACADÉMICO - PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



TESIS

MICROPROPAGACIÓN DE *Ananas comosus* (L.) Merr.
CULTIVAR MD-2 "GOLDEN", MEDIANTE UN SISTEMA
DE INMERSIÓN TEMPORAL

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADO POR EL BACHILLER:

WAGNER ALVERCA GÁLVEZ

TARAPOTO - PERÚ

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE AGROSILVO PASTORIL
ESCUELA ACADÉMICO - PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



TESIS

MICROPROPAGACIÓN DE *Ananas comosus* (L.) Merr.
CULTIVAR MD-2 "GOLDEN", MEDIANTE UN SISTEMA DE
INMERSIÓN TEMPORAL

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADO POR EL BACHILLER:
WAGNER ALVERCA GÁLVEZ

TARAPOTO – PERÚ
2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE AGROSILVO PASTORIL
ESCUELA ACADÉMICO - PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

ÁREA DE MEJORAMIENTO Y PROTECCIÓN DE CULTIVOS

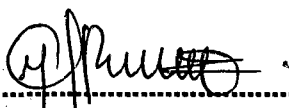
TESIS

MICROPROPAGACIÓN DE *Ananas comosus* (L.) Merr.
CULTIVAR MD-2 "GOLDEN", MEDIANTE UN SISTEMA DE
INMERSIÓN TEMPORAL

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADO POR EL BACHILLER:
WAGNER ALVERCA GÁLVEZ

COMITÉ DE TESIS



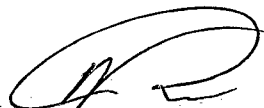
.....
Ing. MARIA EMILIA RUIZ SANCHEZ
Presidente de Jurado



.....
Ing. ROALDO LÓPEZ FULCA
Secretario de Jurado



.....
Ing. M.Sc. TEDY CASTILLO DIAZ
Miembro de Jurado



.....
Blgo. M.Sc. Dr. WINSTON FRANZ RIOS RUIZ
Asesor

DEDICATORIA

En mención especial a mi familia por la generosidad y confianza.

A mis padres LORGIO Y MARTHA, por el apoyo y motivación incondicional en mi formación como persona y futuro profesional.

A LEYDI, OMAR, mis hermanos, por ser mis grandes amigos y compartir grandes momentos juntos.

A mis queridos ABUELOS, TIOS y PRIMOS, que siempre me brindan su apoyo moral en todo momento.

AGRADECIMIENTO

Al Biólogo Dr. Winston Franz Rios Ruiz, por su generosidad como asesor del presente trabajo de investigación.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNSM – T, quienes contribuyeron en mi formación profesional.

Mi agradecimiento especial al Ing. Henni Delgado Haya, por la oportunidad de permitirme realizar la tesis, impartirme invaluable conocimiento y experiencia profesional.

Al Biólogo Marco León Martínez, por aportar opiniones juiciosas durante la realización de la tesis.

A la Señora Juliana Rodríguez García, por el apoyo y recomendaciones en la ejecución de la investigación.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Antecedentes y generalidades del cultivo de la piña	4
3.1.1. Origen y distribución	4
3.1.1.1. Origen del cultivar MD-2	4
3.2. Aspectos generales del cultivo <i>in vitro</i> de tejidos	5
3.2.1. La micropropagación vegetativa	5
3.2.2. Ventajas y desventajas del cultivo <i>in vitro</i>	5
3.2.3. Etapas necesarias para generar plantas a partir de explantes aislados	7
3.2.4. Propagación natural de la piña	8
3.3. ¿Qué es un sistema de inmersión temporal (SIT)?	8
3.3.1. Antecedentes del SIT e investigaciones similares	9
3.3.1.1. Importancia del SIT	9
3.3.1.2. Ventajas y desventajas del SIT en el cultivo de tejidos	10
3.3.1.3. Parámetros de cultivo que afectan la eficacia en sistemas de inmersión temporal	12
3.3.1.4. Coeficientes de multiplicación mediante la micropropagación de especies vegetales	14
3.3.1.5. Propagación <i>in vitro</i> de la especie (<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.)	15
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1. Fuente de explantes	25
4.2. Metodología	25
4.2.1. Ubicación del experimento	25
4.2.1.1. Ubicación política	25
4.2.1.2. Ubicación geográfica	26
4.2.2. Procedimiento para la micropropagación de piña cultivar MD-2 "Golden"	26
4.2.3. Limpieza y extracción de hojas de la corona	26
4.2.4. Proceso de asepsia o desinfección (en cámara de flujo laminar)	27
4.2.5. Cultivo <i>in vitro</i> de yemas (explantes) mediante la micropropagación convencional	27
4.2.5.1. Fase de iniciación	27
4.2.5.2. Fase de multiplicación	29
4.2.6. Cultivo de explantes en el sistema de inmersión temporal (SIT)	29
4.2.6.1. Descripción del sistema de inmersión temporal	29

4.2.6.2.	Protocolo para la preparación de biorreactores de inmersión temporal	30
4.2.6.3.	Protocolo para la desinfección y esterilización del BIT	32
4.2.6.4.	Procedimiento de introducción de explantes al BIT (en cámara de flujo laminar)	33
4.2.6.5.	Fase de multiplicación	35
4.2.6.6.	Fase de elongación	36
4.2.6.7.	Fase de enraizamiento	36
4.2.7.	Fase de aclimatación	37
4.2.8.	Condiciones de cultivo	38
4.2.9.	Tratamientos en estudio	39
4.2.10.	Diseño experimental	39
4.2.11.	Variables evaluadas	40
V.	RESULTADOS	44
VI.	DISCUSIONES	50
6.1.	Contaminación	50
6.2.	Del número de plántulas a la cosecha	51
6.3.	Del número de plántulas Clase A (8-12 cm)	53
6.4.	Del número de plántulas Clase B (4-8 cm)	55
6.5.	Del número de plántulas Clase C (0-4 cm)	56
6.6.	De la altura de plántulas a la cosecha	58
6.7.	De las plántulas sembradas Vs. Plántulas aclimatadas según clase	59
6.8.	De los costos de producción	61
VII.	CONCLUSIONES	63
VIII.	RECOMENDACIONES	65
IX.	BIBLIOGRAFÍA	66
	RESUMEN	
	SUMMARY	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE CUADROS

Pág.

Cuadro 1:	Comportamiento de la frecuencia y tiempo de inmersión para algunos cultivos tropicales	14
Cuadro 2:	Coeficientes de multiplicación en la propagación convencional y mediante el uso del SIT	14
Cuadro 3:	Materiales utilizados en la preparación del BIT	30
Cuadro 4:	Repeticiones, densidad de inóculo (número de explantes/BIT), tratamientos	40
Cuadro 5:	Análisis de varianza para el Número de plántulas a la cosecha (datos transformados por \sqrt{x})	44
Cuadro 6:	Análisis de varianza para el Número de plántulas Clase A (8-12 cm) (datos transformados por \sqrt{x})	45
Cuadro 7:	Análisis de varianza para el Número de plántulas Clase B (4 -8 cm) (datos transformados por \sqrt{x})	46
Cuadro 8:	Análisis de varianza para el Número de plántulas Clase C (0-4 cm) (datos transformados por \sqrt{x})	47
Cuadro 9:	Análisis de varianza para la Altura de plántulas a la cosecha (cm)	48

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Pág.

Gráfico 1: Número de BIT's contaminados según tratamientos	44
Gráfico 2: Prueba múltiple de Duncan ($\alpha = 0,05$) para los promedios de tratamientos respecto al Número de plántulas a la cosecha	45
Gráfico 3: Prueba múltiple de Duncan ($\alpha = 0,05$) para los promedios de tratamientos respecto al Número de plántulas Clase A (8-12 cm)	46
Gráfico 4: Prueba múltiple de Duncan ($\alpha = 0,05$) para los promedios de tratamientos respecto al Número de plántulas Clase B (4 - 8 cm)	47
Gráfico 5: Prueba múltiple de Duncan ($\alpha = 0,05$) para los promedios de tratamientos respecto al Número de plántulas Clase C (0 - 4 cm)	48
Gráfico 6: Prueba múltiple de Duncan ($\alpha = 0,05$) para los promedios de tratamientos respecto a la altura de plántulas a la cosecha	49
Gráfico 7: Número de plántulas sembradas Vs. Numero de plántulas aclimatadas según clase	49

ÍNDICE DE FOTOS

Pág.

Foto 1:	Coronas de piña "Golden"	26
Foto 2:	Cormo mostrando yemas	26
Foto 3:	Yemas axilares con tejido basal	27
Foto 4:	Yemas axilares idóneas para la inoculación	28
Foto 5:	Inoculación de yemas axilares en el medio de cultivo	28
Foto 6:	Inducción y crecimiento de la yema	28
Foto 7:	Multiplicación de brotes (1° subcultivo)	29
Foto 8:	Multiplicación de brotes (5° subcultivo)	29
Foto 9:	Filtros hidrofóbicos conectados	29
Foto 10:	Pegamento para las tapas	32
Foto 11:	Ubicación de la manguera	32
Foto 12:	Unidad BIT	32
Foto 13:	Esterilización (con luz UV) de BIT's y medio de cultivo	33
Foto 14:	Explantos seleccionados	34
Foto 15:	Inoculación de explantes	34
Foto 16:	Conexión de BIT's	34
Foto 17:	BIT's en el área de incubación	34
Foto 18:	Plántulas de piña (3er subcultivo)	35
Foto 19:	Plántulas con 2-3 cm	35
Foto 20:	Proliferación de brotes (3ra semana)	35
Foto 21:	Plántulas con 6 semanas de cultivo	35
Foto 22:	Plántulas con 9 semanas de cultivo	36
Foto 23:	Plántulas con 12 semanas de cultivo	36
Foto 24:	Plántulas después de 16 semanas de cultivo	37
Foto 25:	Sustrato esterilizado	37
Foto 26:	Luxómetro	38

Foto 27: Termohigrómetro	38
Foto 28: BIT's en estado aséptico	40
Foto 29: Plantas según clase	41
Foto 30: Determinando altura de planta	41
Foto 31: Plantas con diferentes alturas	41
Foto 32: Plantas clase C (después de 21 días)	42
Foto 33: Plantas clase B (después de 21 días)	42
Foto 34: Plantas clase A (después de 21 días)	42

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de piña representa una importante actividad para la dinámica agropecuaria peruana, y en la región San Martín se viene cultivando en la provincia de Rioja, Lamas, Tocache, San Martín, Mariscal Cáceres, Huallaga, El Dorado, contando con una superficie sembrada de 1238,60 hectáreas en el 2011 DRASAM – DEA (2012).

En la actualidad la actividad piñera, está desarrollándose a través de la propagación vegetativa de un cultivar de cayena lisa conocido como “piña lamista” de forma predominante en la región San Martín, al no disponer del suficiente material vegetal o “semilla” para el establecimiento de nuevas plantaciones del cultivar más cotizado (MD-2) en el mercado mundial de piña, también, el material vegetativo es muy escaso, si tenemos en consideración que se necesitan aproximadamente de 30,000 a 40,000 plantas por hectárea. Teniendo que recurrir a la técnica de micropropagación vegetativa, una alternativa para obtener gran cantidad de material vegetal a partir de poco material vegetal de origen (explante) y en corto tiempo.

Con la finalidad de producir grandes volúmenes de plantas, el presente trabajo de investigación estableció un procedimiento de micropropagación de *Ananas comosus* (L.) Merr. cultivar MD-2 “Golden”, mediante un sistema de inmersión temporal (SIT), considerados como sistemas semi-automatizados, basado en el contacto intermitente del medio de cultivo líquido con los explantes por un corto período de tiempo y la consecuente renovación de la atmósfera gaseosa, aumentando el coeficiente de multiplicación y la calidad de los brotes, según <http://www.ecured.cu/index.php>.

La hipótesis planteada, consistió que al realizar el siguiente experimento con 3 densidades de cultivo, 3 BIT's por densidad, deberíamos obtener una diferencia entre el número total de plántulas/BIT propagadas para las tres densidades (7, 10 y 13 explantes).

II. OBJETIVOS

2.1 General

Determinar un protocolo eficiente para la micropropagación de *Ananas comosus* (L.) Merr. cultivar MD-2 "Golden", mediante un sistema de inmersión temporal.

2.2 Específicos

Determinar el número de explantes que permitan obtener una alta tasa de multiplicación de brotes.

Obtener el mayor número de plántulas con la altura suficiente para la etapa de aclimatación.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Antecedentes y generalidades del cultivo de la piña

3.1.1. Origen y distribución

La piña es una planta herbácea, perenne, monocotiledónea, que pertenece a la familia Bromeliaceae. Procede de las zonas tropicales y subtropicales de Brasil y Paraguay, de donde se ha diseminado a todas las regiones del mundo que poseen climas aptos para su producción comercial. Las mayores producciones se tienen en Hawái, México, Costa Rica, Brasil, Colombia, Honduras, República Dominicana, Malasia, India, Congo, Kenia, China, Taiwán, Vietnam, Australia, Filipinas, Bangladesh, Tailandia, Indonesia, sur África, Zaire y Costa de Marfil (Paull 1997, Jiménez 1999, citado por Grateriaux (2009).

3.1.1.1. Origen del cultivar MD-2

Según Sáenz (2007), durante los años 70's, el Instituto de Investigación en Piña de Hawái (Pineapple Research Institute - PRI) siguiendo exitosamente su programa de mejoramiento genético apoyado y conformado por productores (Maui Land & Pineapple), la empresa privada (Del Monte, Dole) e investigadores (Universidad de Hawái - UH), logra obtener dos líneas hermanas; la 73-50 (comercializada como Hawái Gold) y la 73 - 114 (comercializada como Royal Coast) mismas que dan inicio a las piñas de pulpa amarilla, llamadas extra dulces, doradas o tipo Golden; la línea 73 - 114, conociéndose inicialmente así como la famosa MD-2.

3.2. Aspectos generales del cultivo *in vitro* de tejidos

El Cultivo de Tejidos, como técnica, consiste en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Roca y Mroginski, 1991).

3.2.1. La micropropagación vegetativa

La micropropagación (propagación clonal por cultivo *in vitro*) constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura, ya que se la usa en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales (Segretín, 2010).

3.2.2. Ventajas y desventajas del cultivo *in vitro*

Según Pierik (1987):

Ventajas

- La multiplicación *in vitro* es más rápida que la multiplicación *in vivo*.
- A veces es posible propagar especies *in vitro*, que no pueden ser multiplicadas *in vivo*.
- El crecimiento de las plantas propagadas *in vitro* es frecuentemente más vigoroso que el de las clonadas *in vivo*.
- Utilizando el cultivo *in vitro* es posible, en principio, conseguir una multiplicación libre de enfermedades.
- Se necesita una cantidad de material relativamente pequeña para iniciar un cultivo *in vitro*.

- El área que se necesita para el cultivo de portainjertos y lechos de multiplicación queda disminuida.
- Las plantas son cultivadas con su propio sistema radical.
- Para el mejorador profesional se encuentran además las siguientes ventajas adicionales:
 - Se puede lanzar comercialmente un nuevo cultivar, en menos tiempo.
 - Es frecuentemente posible llegar a obtener pequeños clones de forma rápida.
 - Obtener fácilmente mutantes en el proceso de inducción de vástagos adventicios.
 - Es especialmente útil para el establecimiento de bancos de genes.
 - En relación con la manipulación genética, la regeneración de plantas a partir de protoplastos y células es indispensable.
 - Algunas plantas tienen que ser mantenidas y multiplicadas forzosamente de forma vegetativa: plantas sexualmente estériles, aneuploides raros, o plantas con combinaciones poco usuales de cromosomas.

Desventajas

- En algunos sistemas de propagación *in vitro* la estabilidad genética es débil.
- Las plantas producidas *in vitro* pueden mostrar características poco convenientes *in vivo*.
- En el caso de las plantas leñosas especialmente, la inducción de raíces es con frecuencia muy difícil.

- Cuando las plantas, han sido clonadas *in vitro* y después trasplantadas al suelo, existe el peligro de que el clon muera por la acción de patógenos.
- Se puede perder la capacidad de regeneración por cultivos de callos o células en suspensión, repetidos.
- En algunos casos el aislamiento estéril es extremadamente difícil de realizar.
- Exige una aportación de mano de obra importante, lo que redonda en precios relativamente altos en la producción de plantas.

3.2.3. Etapas necesarias para generar plantas a partir de explantes aislados

Según Segretín (2010), la multiplicación vegetativa *in vitro*, implica el desarrollo de las siguientes etapas:

- 1) **Elección** de la planta y/o tejido donante de explantos.
- 2) **Establecimiento**, que consiste en la desinfección de los explantos (generalmente con hipoclorito de sodio) y su posterior adaptación al medio artificial de modo de inducir callo, brote, raíz o embrión somático según se desee.
- 3) **Multiplicación**, para generar una masa vegetal suficiente para la regeneración del número de plantas necesarias.
- 4) **Enraizamiento**, en la que se busca la formación de raíces con el fin de convertir los brotes o embriones somáticos en plántulas completas.
- 5) **Rusticación**, que es la aclimatación de las plántulas obtenidas *in vitro* a las condiciones ambientales *ex vitro* (suelo o algún sustrato inerte).

3.2.4. Propagación natural de piña

Pac (2005), nos dice que el método comúnmente usado para la producción de plantas comerciales de piña es el vegetativo. Existen tres tipos de materiales:

Chupones: Proviene de yemas vegetativas que salen del tallo (cualquier yema axilar de las hojas pueden formar un chupón). Ocurren dos tipos de chupones: 1. chupones de suelo; 2. chupones aéreos. Ambos materiales son morfológicamente iguales.

Esquejes: Estos se diferencian de los chupones en que tienen una base abultada y son inflorescencias abortadas. Existen dos tipos de esquejes:

1. esquejes basales son los que se desarrollan debajo del fruto;
2. esquejes de corona estos se desarrollan debajo de la corona del fruto.

Coronas del Fruto: consisten en el follaje que tiene el fruto en la parte superior.

Las plantas provenientes de dichos materiales vegetativos antes mencionados entran en producción a partir de:

Chupones: de 14-18 meses para producir frutos.

Esquejes: de 18-20 meses para producir frutos.

Coronas del fruto: de 20-22 meses para producir frutos.

3.3. ¿Qué es un sistema de inmersión temporal (SIT)?

Según <http://www.ecured.cu/index.php>, son sistemas semi-automatizados en la propagación *in vitro*. Está basado en el contacto intermitente del medio de cultivo líquido con los explantes por un corto período de tiempo y la

consecuente renovación de la atmósfera gaseosa, para evitar la hiperhidricidad de los tejidos y la acumulación de gases tóxicos.

Etienne y Berthouly (2002), mencionan que Harris y Mason (1983) describen a los SIT como máquinas basculantes diseñadas para lograr una inmersión temporal, a fin de combinar la aireación y los efectos positivos del medio de cultivo líquido.

3.3.1. Antecedentes del SIT e investigaciones similares

El lugar donde se dio origen a esta técnica fue Francia, y más tarde adoptada en Cuba, donde ha tomado gran auge, solo se han trabajado cultivos tropicales (bananos, cítricos, piña, caña de azúcar). Aunque se han desarrollado diversos trabajos en varias especies de plantas ornamentales por esta técnica de cultivo (Ministerio de Agricultura – FIA, 2004).

Newton *et al.*, (2009), menciona que el primer informe sobre el uso del biorreactor para propagación vegetal fue hecho por Takayama y Misawa (1981), mediante la propagación de begonia.

3.3.1.1. Importancia del SIT

<http://www.ecured.cu/index.php>, considera lo siguiente:

Permite airear los tejidos de los brotes unido al contacto completo de los mismos con el medio, lo que facilita una mayor incorporación y asimilación de los nutrientes por los tejidos y como consecuencia aumenta el coeficiente de multiplicación y la calidad de los brotes. Estos sistemas alternativos con

el empleo de medio de cultivo líquido se han desarrollado con el propósito de automatizar, al menos las fases que requieran mayor manipulación del proceso *in vitro* y con ello, la consiguiente reducción de los costos de producción. Tienen la finalidad de producir grandes volúmenes de plantas.

El principio de funcionamiento de los SIT se basa en la posibilidad de absorción de nutrientes y otras sustancias por las plantas *in vitro*, durante períodos alternos de inmersión en el medio de cultivo líquido y posterior permanencia en el recipiente sin el medio de cultivo (aunque sí con una atmósfera de una elevada humedad relativa), incrementando notablemente la oxigenación del medio interno, lo cual influye positivamente en el crecimiento y multiplicación de las plantas (Mulet *et al.*, 1999).

3.3.1.2. Ventajas y desventajas del SIT en el cultivo de tejidos

Ventajas

Etienne y Berthouly (2002), todos estos sistemas consideran las condiciones mencionadas por Teisson *et al.*, (1999):

- Evitar la inmersión continua, la cual tenga efectos adversos sobre el crecimiento y la morfogénesis;
- provisión de transferencia de oxígeno adecuada;
- provisión de suficiente mezcla;
- limitar los niveles de corte;
- activar los cambios secuenciales de medio y automatización;
- reducción de la contaminación;
- de bajo costo.

Desventajas

Según Fitotek (1994), considera las siguientes desventajas:

- **Tamaño de la plántula**

El principal interés en el uso del biorreactor para la propagación masiva es la producción uniforme de plántulas tanto en tamaño y alta calidad. Para evitar que las plántulas sufran la falta de coloración verde en las hojas, deben estar con suficiente iluminación ubicada alrededor del vaso biorreactor.

Diferencia de tamaño fue observado en los resultados del proceso y es evidente que se necesita más investigación para lograr uniformidad de las plántulas propagadas.

- **Variabilidad genética**

Una de las más importantes barreras de la propagación de plantas utilizando el cultivo de tejidos es la variabilidad genética en las plantas regeneradas. Es importante, aunque costosos y demandan de tiempo, para realizar pruebas de fidelidad para comparar las plántulas producidas por el biorreactor con aquellas producidas por medios convencionales de propagación.

3.3.1.3. Parámetros de cultivo que afectan la eficacia en sistemas de inmersión temporal

Etienne y Berthouly (2002), consideran como razones principales las siguientes:

a) Tiempo de inmersión

En sistemas de cultivo con inmersión temporal del tejido, está claro que el tiempo de inmersión es muy importante, desde entonces determinan la absorción de los nutrientes y el control de hiperhidricidad. Los tiempos de inmersión utilizados varían considerablemente. Esto es probablemente debido a la gran variedad de especies, procesos de micropropagación y sistemas de inmersión temporal.

b) Volumen de medio líquido

Debe optimizarse con SIT sin renovación del medio. Mayores volúmenes probados son menos eficientes, y los autores sugirieron que los cultivos producen químicos extracelulares que estimulan la formación de brotes, que se diluyen cuando se utilizan grandes volúmenes de medio.

c) Volumen del envase de cultivo

Para todos los SIT, el volumen del envase, y por lo tanto la capacidad, es mucho mayor que en los contenedores utilizados para procedimientos convencionales. Usando envases más grandes para medios obtienen mayores volúmenes de medio utilizado, que puede tener un efecto positivo en la planta como material de proliferación y crecimiento.

d) La aireación

Los sistemas de propulsión neumática del medio nutritivo causado por aireación forzada para la renovación total de la atmósfera de cultivo en cada inmersión, intercambios de gases en un sistema de este tipo ocurren principalmente durante la inmersión y son causados indirectamente por movimiento del líquido y directamente por la bomba de aire, mencionado por Teisson y Alvard (1995).

Ministerio de Agricultura – FIA (2004), menciona los siguientes factores a estudiar:

- Tiempo y frecuencia de inmersión.
- Tipo y densidad de inóculo.
- Volumen de medio de cultivo.
- Tiempo de proliferación.
- Condiciones de cultivo.
- Genotipo.
- Uso de retardantes del crecimiento.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, es necesario ajustar el tiempo y frecuencia de inmersión (cuadro 1), para cada especie en estudio.

Cuadro 1: Comportamiento de la frecuencia y tiempo de inmersión para algunos cultivos tropicales

Cultivo	Morfogénesis	Tiempo (min.)	Frecuencia (h)
Bananos	Organogénesis	15	3
Café	Organogénesis	1	4
Caucho	Organogénesis	1	4
Cítricos	Embriogénesis	1	4
Bananos	Embriogénesis	-	-
Café	Embriogénesis	-	-
Piña	Organogénesis	2	3
Caña de azúcar	Organogénesis	3	3

Fuente: Ministerio de Agricultura – FIA. 2004.

3.3.1.4. Coeficientes de multiplicación mediante la micropropagación de especies vegetales

La técnica de inmersión temporal, ha permitido el incremento de las tasas de multiplicación con respecto a las técnicas convencionales (cuadro 2).

Cuadro 2: Coeficientes de multiplicación en la propagación convencional y mediante el uso del SIT

Cultivo	Variedad	Propagación convencional	SIT
Piña	Cayena Lisa	8,0	68,8
	MD2	5,8	26,8
Caña de Azúcar	C91-301	3,7	34,1
	C1051-73	4,1	58,0
Banano	FHIA-18	3,8	7,4
	FHIA-01	3,4	10,4
	Gran Enano	4,0	16,6

Fuente: Ministerio de Agricultura – FIA. 2004.

3.3.1.5. Propagación *in vitro* de la especie (*Ananas comosus* (L.) Merr.)

La importancia económica de la piña ha impulsado la investigación biotecnológica en su aprovechamiento. Se han desarrollado diversas estrategias para el mejoramiento tanto de la producción como en el crecimiento. La aplicación de métodos de mejoramiento varía desde la inoculación bacteriana y el cultivo de cromoplastos hasta la inserción de genes específicos, García y Serrano (2005). Pero fue Aghion y Beauchesne los que escribieron por primera vez sobre micropropagación de piña en 1960, citado por Newton *et al.*, (2009).

El aislamiento de protoplastos, muestra que los híbridos somáticos tienen un potencial para obtener nuevos genotipos resistentes de piña. Una de las estrategias biotecnológicas es obtener aislamiento de protoplastos a partir de explantes de hoja. Pinho – Guedes *et al.*, (2002), citado por García y Serrano (2005).

3.3.1.5.1. La contaminación microbiana en los procesos de producción masiva de vitroplantas

La aplicación de diferentes métodos de esterilización (liberación de todos los microorganismos) en la micropropagación de especies vegetales, continúa siendo una estrategia y destreza en la manipulación de los materiales de laboratorio y de origen vegetal, para lograr la calidad del cultivo y plantear alternativas que solucionen una de las principales dificultades encontradas en el cultivo *in vitro*, refiriéndome a la contaminación microbiana.

<http://www.imciencia.com/index.php>, al referirse sobre la calidad en el proceso de producción de una biofábrica, esta se debe entender por:

- % de contaminación. (por hongos y bacterias)
- % de mortalidad.
- % de pérdidas por otras causas.
- Coeficiente de multiplicación.

Es la contaminación microbiana que aparece en los procesos de producción masiva de vitroplantas, por lo que el empleo de la esterilización por calor húmedo mediante la autoclave para eliminar los microorganismos y garantizar la esterilidad de los medios de cultivo es una práctica generalizada, no obstante, muchos componentes de los medios de cultivo se desnaturalizan, se afecta el desarrollo de las plantas y no se logra evitar que aparezcan contaminaciones a los varios días de haberse esterilizado, bajo este principio y dada la acción biológica como bactericida de amplio espectro y fungicida del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (denominado G-1) se estudió la factibilidad de su incorporación como inhibidor químico de la contaminación microbiana de los medios de cultivo en la producción de vitroplantas (Hernández *et al.* 2006).

El 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano presenta una eficiente acción sobre diferentes familias de microorganismos contaminantes en el cultivo *in vitro* de papa, plátano, banano, caña de azúcar, piña, malanga y forestales, con una dosis inferior a los 20 mg/L para los hongos y entre

20-30 mg/L de ingrediente activo para las bacterias. Las concentraciones entre 30 y 40 mg/L de ingrediente activo no son fitotóxicas para las vitroplantas y garantizan la protección ante los contaminantes fungosos y bacterianos, en los límites permisibles sin el empleo de la autoclave, brindando la protección necesaria al sustrato, con contaminaciones inferiores al 5%, resultado positivo en relación a las ventajas del empleo del producto respecto al método tradicional de esterilización por la autoclave. Otro de los aspectos reportados es el aumento del índice de multiplicación que puede llegar hasta 45,4% (Hernández *et al.* 2006).

Fundora *et al.*, (2007), usando el G-1 (2-bromo-5-(2-bromo-2-nitro-vinil)-furano) en la micropropagación de explantes de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cv. MD2, en Biorreactores de Inmersión Temporal con capacidad de 1000 ml, logro obviar la desinfección y esterilización por autoclave del medio de cultivo, los frascos de cultivo y los reservorios del medio del biorreactor de inmersión temporal (BIT), siendo favorable el hecho de que las hormonas, vitaminas y otros componentes termolábiles del medio de cultivo, permanezcan intactos parecen estimular el crecimiento y desarrollo vegetativo de los brotes.

Indudablemente, la incorporación de este esterilizante al medio de cultivo trae consigo una transformación en la formulación del medio que conlleva a un aporte de nuevos elementos químicos, y que no resultan perjudiciales ni tóxicos al cultivo y tal vez puedan beneficiar la calidad nutricional del medio de cultivo y el crecimiento de los brotes. Resultando

la dosis adecuada 28 mg/L, al no afectar la capacidad morfogénica de los brotes de piña en BIT (Fundora *et al.*, 2007).

Delgado (2004), utilizando yemas laterales de *Ananas comosus*, alcanzo un promedio de contaminación de 26,67%, lo cual considero como un porcentaje de contaminación bajo en esta especie, ya que en ensayos preliminares reporto porcentajes entre 90% y 100%; utilizando desinfectantes como el NaOCl en diferentes concentraciones (0.25 y 2%) para las yemas y el autoclavado fue realizado a 121 °C, a 15 lbs de presión por 30 minutos, para la esterilización del medio de cultivo.

3.3.1.5.2. Respuesta de las vitroplantas ante el estímulo de los reguladores del crecimiento y desarrollo

Ángel y Gonzáles (2013), mediante la propagación *in vitro* de piña cultivar golden en un sistema de inmersión temporal, logro que en la fase de multiplicación con un tiempo de 5 minutos de inmersión cada 2 horas, el número promedio de brotes por explantes sea de 9.41, sin embargo al momento de la cosecha de las plántulas el mejor promedio de longitud se obtuvo con un tiempo de 10 minutos de inmersión cada 2 horas, siendo este igual a 8,8 cm. Para este experimento utilizo explantes con una altura promedio de 2 cm como material de inicio, los cuales provenían de la fase de multiplicación subcultivados mediante técnicas convencionales, para la elaboración del medio de cultivo líquido se usó la formulación propuesta por Murashige y Skoog (1962), suplementado con 1 mg/l de BAP (Bencilaminopurina), 30 g/l de sacarosa y pH de 5.7, para la fase de

multiplicación y para la fase de desarrollo el medio de cultivo líquido estuvo compuesto por el mismo medio de cultivo utilizado en la fase de multiplicación pero con los macro y micronutrientes reducidos al 50% y sin la aplicación de BAP.

Basail *et al.*, (2012), determino que el coeficiente de multiplicación y la altura (cm) de las plántulas de plátano vianda "INIVITPV06-30", propagadas *in vitro* en los SIT utilizando como material vegetal plantas provenientes de la fase de multiplicación con tres subcultivos, están influenciados por la interacción del tiempo de inmersión (10 minutos), frecuencia de inmersión (cada 6 horas), medio de cultivo por explante (40 ml) y el número de explantes por frasco de cultivo (90), obteniendo los valores de 14,75 para el coeficiente de multiplicación y 1,43 cm promedio para altura de planta, después de 18 días de cultivo. Se empleó el medio de cultivo de multiplicación constituido por sales MS (1962) con 2,25 mg/l de 6-Bencilaminopurina (6-BAP), 0,65 mg l de ácido indolacético (AIA), 30,0 g/l de sacarosa y 10,0 mg/l de ácido ascórbico.

Espinosa *et al.*, (2007), utilizando vitroplantas de violeta africana y después de evaluar diferentes combinaciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y ácido naftalenacético (ANA), con el empleo del sistema de inmersión temporal en la multiplicación *in vitro* de la especie, logró un mayor número de brotes por explantes cuando se emplearon las combinaciones de 0,5 mg/l y 1,0 mg/l de 6-BAP y 0,1 mg/l de ANA, conjuntamente con el empleo del SIT permitió elevar el índice de

multiplicación de las vitroplantas hasta 21,2 respecto a 9,65 obtenido mediante técnicas convencionales en el mismo estudio. Sin embargo la longitud de las vitroplantas fueron significativamente menores en los SIT, con un valor de 1,13 cm respecto a 2,39 cm obtenido por técnicas convencionales, asumiendo que este resultado pudo estar condicionado por una mayor competencia entre las plantas por los nutrientes y la luz; las inmersiones se realizaron 2 veces a la semana durante 5 minutos.

Escalona *et al.*, (1999), a través de la micropropagación de piña en un sistema de inmersión temporal, obtuvo la mayor tasa de multiplicación (106) al cultivar 120 explantes de 2-3 cm cada uno. Los explantes fueron cultivados en medio de multiplicación (MS + 2,1 mg/l BA + 0,3 mg/l NAA) suplementado con 1 mg/l de paclobutrazol (PB) por 7 semanas. Después del periodo de multiplicación de brotes el medio fue quitado y cambiado por el medio MS suplementado con 0,5 mg/l BA + 1 mg/l AG3, después de 7 días este medio fue reemplazado por un medio MS suplementado con 1 mg/l AG3 para lograr el crecimiento de los brotes; durante las semanas de cultivo las plántulas se sumergieron por 2 minutos cada 3 h.

Escalona *et al.*, (1999), sugieren que las tasas de multiplicación se ven afectadas por el volumen de medio de cultivo por explante, siendo el más adecuado en una relación de 200 ml/explante, obteniendo una tasa de multiplicación igual a 23, encontrándose que volúmenes superiores a este disminuyen el coeficiente de multiplicación.

Escalona *et al.*, (1999), aluden que el uso del medio MS (1962) con ácido giberelico (1 mg/l) estimulo la elongación de los brotes obtenidos en la fase de multiplicación en el sistema de inmersión temporal. Este enfoque demostró la necesidad de lograr la diferenciación y multiplicación de grupos de brotes o clusters antes de tener la influencia del ácido giberelico sobre el crecimiento, y lograr plantas con alto grado de uniformidad.

Delgado (2004), obtuvo la más alta tasa de proliferación al propagar piña mediante procedimientos convencionales del cultivo *in vitro* a partir de yemas axilares provenientes de la corona, con un promedio de 16,8 brotes después de 60 días de cultivo, y estos finalmente llegarían a ser plántulas normales; usando medio liquido M&S a concentración total suplementado con 1,0 mg/L de BAP en la fase de multiplicación de brotes.

3.3.1.5.3. Respuesta de la influencia del sistema de inmersión temporal en la aclimatación de vitroplantas

Escalona *et al.*, (1999), citan que la combinación de un período de 10 semanas para la formación de brotes y 5,0 explantes por litro como inoculación inicial alcanzó el más alto número de plantas aptas para el enraizamiento y aclimatación *ex vitro*; las semanas de cultivo se consideran a partir de la inoculación en el SIT.

Escalona *et al.*, (1999), mencionan que mediante un esquema de producción es posible obtener aproximadamente 120 brotes de ocho

yemas de corona en alrededor de 10 semanas a través de técnicas convencionales. Después de otras 8 semanas, con la multiplicación de estos 120 brotes y el alargamiento de los mismos en los biorreactores de inmersión temporal, se produjeron un total de 6000 brotes competentes listo para el enraizamiento y aclimatación *ex vitro*. Un adicional de 5000–6000 brotes requirieron un tratamiento *in vitro* adicional antes de la aclimatación en su período normal.

Escalona *et al.*, (1999), aluden que plantas menores de 4 cm tienen los niveles más bajos de supervivencia (27%), plantas con una altura entre 4 y 6 cm obtuvieron una supervivencia (55%), pero se consideraban que requieren otros tratamientos *ex vitro* antes del período normal de aclimatación, sin embargo, las plantas más grandes de 6 cm podrían cultivarse directamente en invernadero obteniendo una supervivencia de 90%.

Ángel y Gonzáles (2013), obtuvo plantas con una longitud promedio igual a 8,8 cm, siendo una característica importante para que en la fase de aclimatación logre el 100% de sobrevivencia. Teniendo en cuenta que la micropropagación se realizó mediante el sistema de inmersión temporal.

<http://www.imciencia.com/index.php>, menciona que la aclimatación del material producido por inmersión temporal, ha demostrado tener condiciones favorables para la aclimatación de las plantas. Esta se realiza *ex vitro*, y en el caso de piña y caña, es exitoso casi al 100%, siendo en el

caso de café, necesario que las pequeñas yemas se mantengan por un mayor tiempo de subcultivo, donde se produce la fase de enraizamiento, luego del cual se puede aclimatar. Las plantas que provienen de inmersión poseen laminas foliares serosas comparadas con las plantas húmedas de la propagación convencional, por tanto la deshidratación es menor en las plantas provenientes de estos sistemas durante aclimatación. En tubérculos de papa propagados en inmersión temporal, estos pueden ser guardados bajo condiciones ambientales y trasplantadas directamente a campo sin aclimatación.

Delgado (2004), en el proceso de aclimatación de plántulas de *Ananas comosus* logró un 96.8% de plántulas aclimatadas como promedio, las no aclimatadas fueron plántulas pequeñas o lesionadas durante el proceso de aclimatación, mas no por efectos fisiológicos de este proceso. No se observaron signos de marchites durante los primeros días de aclimatación, lo cual es usual observar en otras especies; esto nos indica la rusticidad de *Ananas comosus* al proceso de aclimatación.

Mas (2013), determino que el porcentaje de supervivencia de las plántulas de piñón (*Jatropha curcas* L.), propagadas *in vitro* a través de embriones cigóticos en el proceso de aclimatación está influenciado por la interacción de los inductores de crecimiento (ANA y AIB) y las concentraciones (3 ppm/20 minutos, 1 ppm/20 minutos y 2 ppm/20 minutos); obteniendo promedios de 94,18 y 95,90% en la etapa de aclimatación para los inductores de crecimiento respectivamente, y

respecto a las concentraciones, estas actúan de igual forma en el porcentaje de supervivencia de plántulas de piñón.

Mohammed y Vidaver (1990), aseguran, que la presencia de raíces en plantas leñosas garantiza alta supervivencia en la aclimatización.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Fuente de explante

Los explantes utilizados en los BIT's, estuvieron constituidos por plántulas de 2 a 3 cm, con dos a tres brotes, las que fueron obtenidos a partir de yemas laterales provenientes de la corona del fruto y cultivadas bajo condiciones *in vitro*; estas coronas de piña fueron obtenidas en un punto de venta de piña "Golden" ubicado en el trayecto de la carretera Tarapoto-Lamas, siendo identificadas por sus características cualitativas (apariencia, forma, sabor, etc.) del cultivar.

4.2. Metodología

4.2.1. Ubicación del experimento

El trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental Agraria "El Porvenir" – Tarapoto – INIA, situado en el distrito de Juan Guerra a 14,5 Km de la ciudad de Tarapoto, vía carretera Fernando Belaúnde Terry (Tarapoto - Juanjui). A continuación detallamos la ubicación política y geográfica:

4.2.1.1. Ubicación política

Región	:	San Martín
Departamento	:	San Martín
Provincia	:	San Martín
Distrito	:	Juan Guerra

4.2.1.2. Ubicación geográfica

Longitud Oeste	:	76° 21' 15"
Latitud Sur	:	06° 36' 15"
Altitud	:	330 m.s.n.m.m.
Zona de Vida	:	bs-T (Holdridge, 1978)

4.2.2. Procedimiento para la micropropagación de piña cultivar MD-2 "Golden"

4.2.3. Limpieza y extracción de hojas de la corona

El material vegetal utilizado en el establecimiento del cultivo *in vitro* procedió de coronas de frutos de piña (foto 1), las cuales se seleccionaron previamente. Teniendo en consideración la procedencia del material, y para evitar futura contaminación por causa de agentes patógenos en la fase de introducción o establecimiento, se procedió al lavado de las coronas con agua para eliminar impurezas. A las coronas se les realizó un corte en la zona basal para lograr retirar el tejido muerto, se extrajeron totalmente las hojas para exponer las yemas. Los talluelos o cormos (foto 2) se sometieron a un lavado en solución de agua con detergente por 10 minutos, en continua agitación, después se removió los residuos del detergente mediante lavados con agua destilada.



Foto 1: Coronas de piña "Golden"

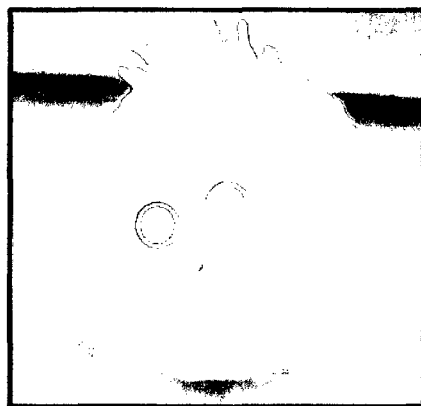


Foto 2: Cormo mostrando yemas

4.2.4. Proceso de asepsia o desinfección (en cámara de flujo laminar)

a) Primera desinfección

Se transfirieron los cormos a una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1% con 2 gotas de tween 80 (por cada 100 ml), sumergidos por 10 minutos en continua agitación, luego son lavados por tres veces con agua destilada estéril.



Foto 3: Yemas axilares con tejido basal

La extracción de las yemas axilares (foto 3) se realizó con parte del tejido basal, y con la ayuda de un bisturí.

b) Segunda desinfección

Las yemas extraídas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0,5% con 2 gotas de tween 80 (por cada 100 ml), por 5 minutos en continua agitación, lavándose por tres veces con agua destilada estéril. Retiramos el tejido basal de las yemas.

4.2.5. Cultivo *in vitro* de yemas (explantos) mediante la micropropagación convencional

4.2.5.1. Fase de iniciación

Las yemas idóneas (foto 4) previamente extraídas o aisladas, se inocularon (foto 5) en un medio (anexo 1), con sales MS (Murashige y Skoog, 1962) a concentración media, suplementado con tiamina 0,4 mg/L + sacarosa 30

g/L + 6-BAP 3 mg/L + 100 ml/L de endospermo líquido de coco + G-1 30 mg/L, pH = 5,7 para darle condiciones *in vitro* y haber logrado la supresión de latencia, diferenciación del tejido meristemático e inducción de crecimiento (foto 6); procedimiento desarrollado en la cámara de flujo laminar y después llevado a constante agitación (30 rpm).

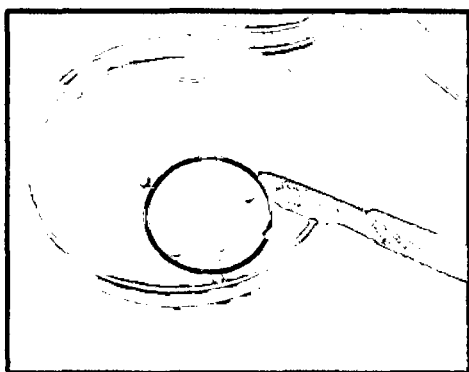


Foto 4: Yemas axilares idóneas para la inoculación

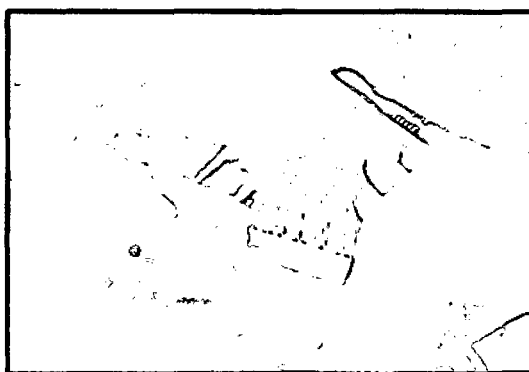


Foto 5: Inoculación de yemas axilares en el medio de cultivo

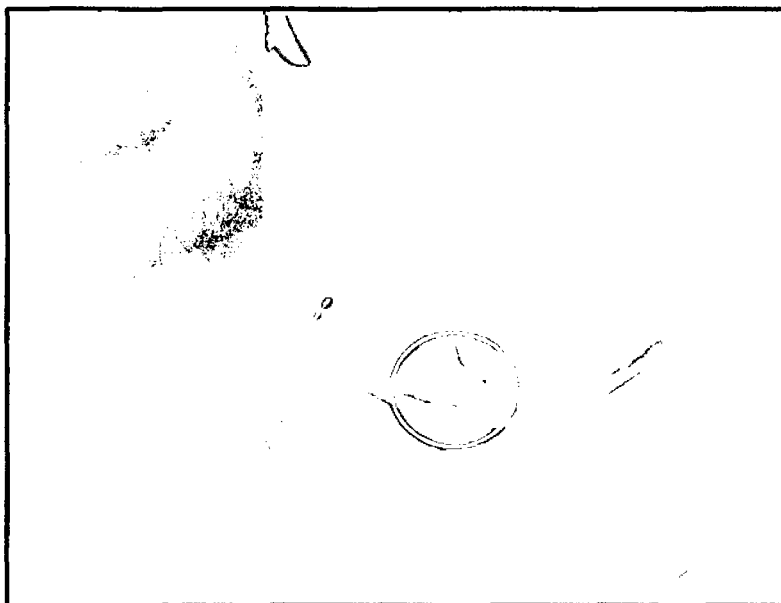


Foto 6: Inducción y crecimiento de la yema

4.2.5.2. Fase de multiplicación

Una vez obtenidos los brotes en la fase previa, estos se transfirieron a un medio (anexo 2), con sales MS (Murashige y Skoog, 1962) a concentración total, suplementado con tiamina 0,4 mg/L + ácido nicotínico 0,5 mg/L + 6-BAP 2 mg/L + ANA 0,3 mg/L, + sacarosa 30 g/L, pH = 5,7 hasta lograr la multiplicación de botes (foto 7 y 8), y completar los cinco subcultivos.

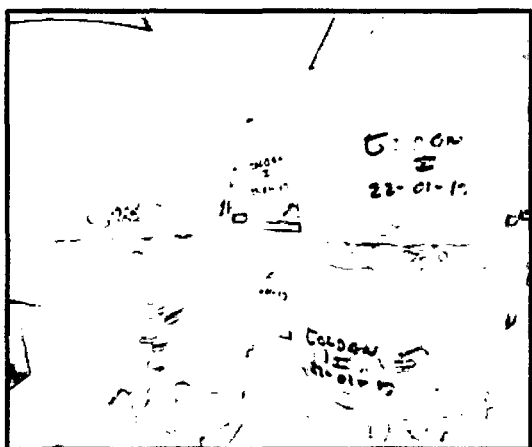


Foto 7: Multiplicación de brotes
(1° subcultivo)

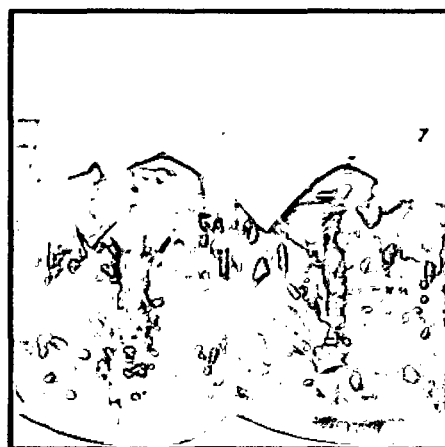


Foto 8: Multiplicación de brotes
(5° subcultivo)

4.2.6. Cultivo de explantes en el sistema de inmersión temporal (SIT)

4.2.6.1. Descripción del sistema de inmersión temporal

El sistema estuvo constituido por dos botellas de plástico; uno para el cultivo de plantas y un depósito para el medio líquido. Las dos botellas conectadas por una manguera de plástico flexible constituyen 1 unidad BIT. En cada caso, el flujo de aire fue esterilizado por el

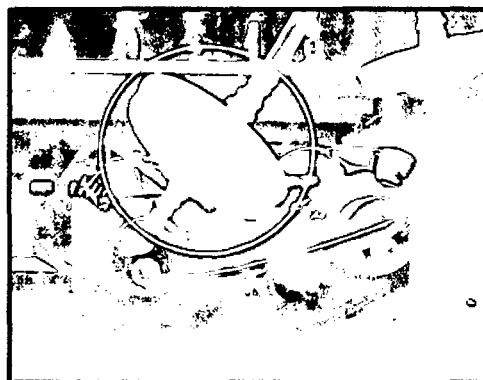


Foto 9: Filtros hidrofóbicos conectados

paso a través de filtros hidrofóbicos (foto 9) de 0,2 μ m. La presión de aire generada por un compresor, empujará el medio de una botella a otra para

sumergir las plantas completamente. Finalmente el flujo de aire se revertirá para retirar el medio del envase de cultivo de plantas. Las botellas utilizadas tenían una capacidad de 5 litros.

Temporizadores digitales controlaron la frecuencia (cada 4 horas) y duración del periodo de inmersión (4 minutos); válvulas de solenoide de tres vías proporcionan funcionamiento on/off.

4.2.6.2. Protocolo para la preparación de biorreactores de inmersión temporal

a) Materiales utilizados:

Para la preparación de los BIT's los materiales utilizados son de uso común, por tanto accesibles tal como muestra el cuadro 3.

Cuadro 3: Materiales utilizados en la preparación del BIT

Cantidad	Producto	Características	Ubicación en el BIT
18	Botellas de plástico	Forma: rectangular Capacidad: 5 litros	
1	Pegamento		
72	Anillos de aluminio	Forma: circulares	En las tapas de las botellas
36	Tubos de aluminio	Largo aprox.: 3,5 cm Diámetro: 1/4"	En las tapas de las botellas.
18	Mangueras de plástico	Largo aprox.: 35 cm Diámetro: 1/4"	Dentro de las botellas.
9	Mangueras de plástico	Largo aprox.: 25 cm Diámetro: 1/4"	Conectan las botellas.
18	Mangueras de plástico	Largo aprox.: 12 cm Diámetro: 1/4"	Conecta las botellas al filtro.

b) Procedimiento:

1. Se cortaron los tubos de aluminio y las mangueras de plástico según las medidas recomendadas.
2. Se realizó dos orificios en las tapas de las botellas de plástico con la ayuda de un tubo de metal.
3. Se colocaron los tubos de aluminio en los orificios realizados en las tapas.
4. Luego se preparó la mezcla del pegamento (foto 10) e introducimos junto a los tubos de aluminio, y sobreponer los anillos de aluminio; esperamos el secado del pegamento.
5. Se colocó una manguera de plástico (foto 11) con aproximadamente 35 cm en un extremo del tubo de aluminio N° 01, que se ubicara dentro de la botella N° 01.
6. Se tomó otra manguera de plástico con aproximadamente 12 cm y la conectamos al tubo de aluminio N° 02, que se encuentra en la botella N° 01.
7. Los pasos 5 y 6 se repetirán para las demás botellas.
8. Finalmente se conectó la botella N° 1 y 2, con una manguera de plástico de aproximadamente 25 cm, conformando la denominada unidad de biorreactor de inmersión temporal (BIT), tal como muestra la foto 12.



Foto 10: Pegamento para las tapas

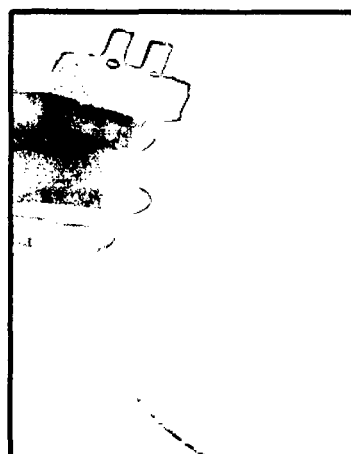


Foto 11: Ubicación de la manguera



Foto 12: Unidad BIT

4.2.6.3. Protocolo para la desinfección y esterilización del BIT

a) Desinfección de tapas y mangueras de plástico (en cámara de flujo laminar)

1. Se preparó la solución de NaOCl al 0,05%.
2. Se sumergieron las tapas y manguera en dicha solución, por 15 minutos.

3. Se lavó con agua destilada estéril, para retirar residuos del NaOCl.
4. Se dejó los materiales en la cámara hasta que se pierda el exceso de agua.

b) Desinfección de botellas de plástico (en cámara de flujo laminar)

1. Se preparó la solución de NaOCl al 0,05%, y enjuagamos.
2. Lavamos con agua destilada estéril.
3. Dejamos los materiales en la cámara hasta que se pierda el exceso de agua.

c) Esterilización del BIT, mediante irradiación (luz UV)

Después de haber desinfectado y preparado las unidades BIT, estas se esterilizan (foto 13) mediante irradiación (luz UV) por 60 minutos, proceso mediante el cual se libera de cualquier microorganismo vivo o espora.



Foto 13: Esterilización (con luz UV) de BIT's y medio de cultivo

4.2.6.4. Procedimiento de introducción de explantes al BIT (en cámara de flujo laminar)

1. Seleccionamos los explantes (foto 14).

2. Inoculamos explantes (foto 15) en la botella estéril N° 01.
3. Luego se disolvió el esterilizante químico (G-1), para luego depositarlo en la botella estéril N° 02 del BIT.
4. Se dispensó el medio de cultivo líquido estéril, en la botella N° 02.
5. Luego se sellaron las tapas de las botellas, con la ayuda de la cinta.
6. Se conectaron los filtros esterilizados a las mangueras ubicadas en las tapas.
7. Finalmente se llevarán los BIT's al área de incubación, para la conexión (foto 16) con las mangueras transportadoras de aire comprimido y darle las condiciones de cultivo (foto 17).



Foto 14: Explantes seleccionados



Foto 15: Inoculación de explantes



Foto 16: Conexión de BIT's

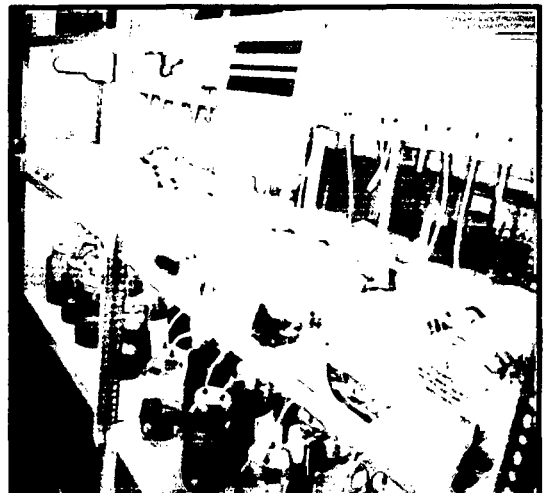


Foto 17: BIT's en el área de incubación

4.2.6.5. Fase de multiplicación

Los explantes utilizados fueron multiplicados mediante técnicas convencionales *in vitro* a partir de 5 yemas axilares, estos procedieron del tercer subcultivo (foto 18), y estuvieron constituidos por plántulas de 2 a 3 cm (foto 19), que se cultivaran en un medio (anexo 3) con sales MS (Murashige y Skoog, 1962) a concentración total, suplementado con tiamina 0,4 mg/L + ácido nicotínico 0,5 mg/L + 6-BAP 2,1 mg/L + ANA 0,3 mg/L, + sacarosa 30 g/L, pH = 5,8 por un periodo de 6 semanas para inducir a la proliferación de brotes (foto 20) y la obtención de una alta tasa de multiplicación (foto 21).

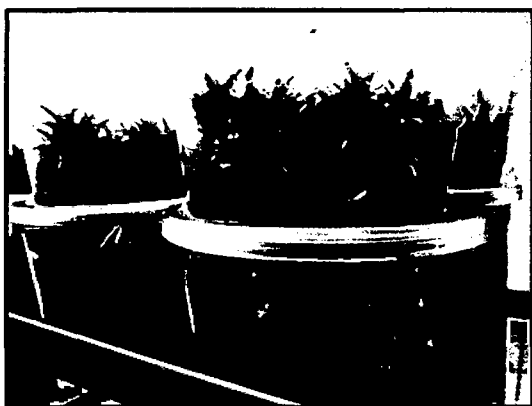


Foto 18: Plántulas de piña (3er subcultivo)

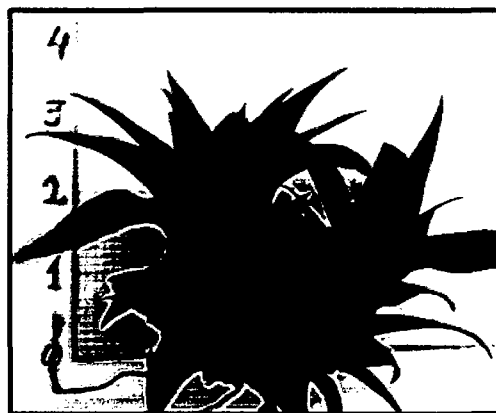


Foto 19: Plántulas con 2-3 cm



Foto 20: Proliferación de brotes (3ra semana)

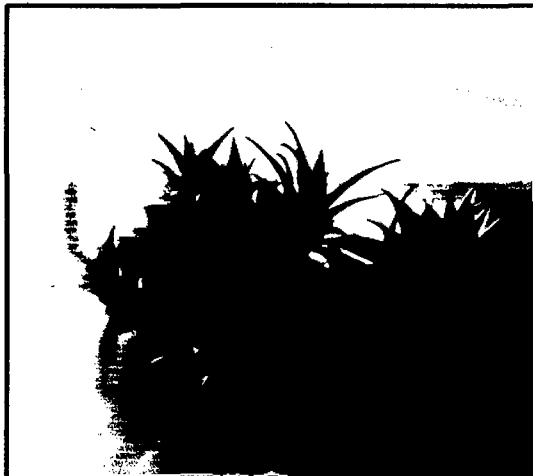


Foto 21: Plántulas con 6 semanas de cultivo

4.2.6.6. Fase de elongación

Después de la sexta semana se procedió a cambiar el medio para multiplicación por el medio (anexo 4) que tenía la siguiente formulación: MS (Murashige y Skoog, 1962) a concentración total, suplementado con tiamina 0,4 mg/L + ácido nicotínico 0,5 mg/L + 6-BAP 2,1 mg/L + AG3 1 mg/L, + sacarosa 30 g/L, pH = 5,8 por un periodo de 6 semanas hasta que se logró el crecimiento de las plántulas (foto 22 y 23).



Foto 22: Plántulas con 9 semanas de cultivo



Foto 23: Plántulas con 12 semanas de cultivo

4.2.6.7. Fase de enraizamiento

Transcurrido las 6 semanas, las plántulas estuvieron preparadas para cambiar el medio de elongación por un medio (anexo 5) para enraizamiento, el cual tenía la siguiente formulación: MS (Murashige y Skoog, 1962) a concentración total, suplementado con tiamina 0,4 mg/L + ácido nicotínico 0,5 mg/L + endospermo liquido de coco 20% + sacarosa 30 g/L, pH = 5,8 por un periodo de 4 semanas hasta que se logró el desarrollo radicular.



Foto 24: Plántulas después de 16 semanas de cultivo

4.2.7. Fase de aclimatación

Del número total de plántulas obtenidas en el sistema de inmersión temporal, después de 16 semanas, se tuvo en cuenta la siguiente clasificación:

Las plantas se seleccionaron en clases (A: 12-8 cm, B: 4-8 cm, C: 0-4 cm), siguiendo una metodología similar propuesta por Escalona *et al.* (1999), y basados en estos resultados, plantas con longitudes mayores de 4 cm se consideran competentes para enraizamiento *ex vitro* y aclimatación.

El sustrato empleado estuvo constituido por dos partes de cascarilla de arroz más una parte de arena, estableciendo una relación de 2:1; la esterilización se realizó en autoclave a 121 °C, a 15 lbs de presión por un período de 30 minutos.



Foto 25: Sustrato esterilizado

Las plantas antes de ser sembradas en el sustrato para la aclimatación, se sumergieron en una solución de fungicida (carbendazim 1,5 ml/L) + bioactivador enzimático-antioxidante-antiestres (2,5 ml/L) por 15 minutos. En el vivero se realizaron riegos constantes y se hizo aplicaciones de fertilizantes foliares (20-20-20) en una dosis de 3 g/l.

4.2.8. Condiciones de cultivo

Los explantes y plántulas fueron mantenidos en el ambiente de incubación bajo las siguientes condiciones de cultivo (anexo 6), indicadas por los instrumentos utilizados (foto 26 y 27):

- Luz: bajo una intensidad luminosa de 2,400 lux/m².
- Fotoperiodo: se mantuvo bajo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.
- Temperatura del área de incubación: se mantuvo un promedio de 25 °C.
- Humedad relativa del área de incubación: se mantuvo una baja humedad promedio de 27%.
- Humedad relativa dentro del BIT: con una humedad promedio equivalente a 96%.

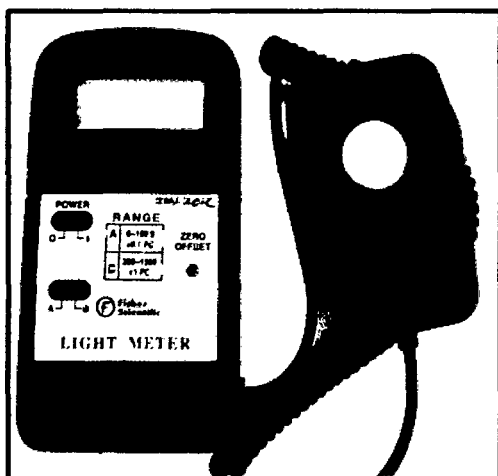


Foto 26: Luxómetro



Foto 27: Termohigrómetro

4.2.9. Tratamientos en estudio

El estudio experimental que se realizó utilizando material vegetal proveniente de la propagación convencional *in vitro* de piña, a través de yemas axilares de la corona del fruto, tuvo como fin evaluar la tasa de multiplicación y el total de plántulas aprovechables utilizando un sistema de inmersión temporal.

Los tratamientos en estudio, fueron: 7 explantes/BIT, 10 explantes/BIT, 13 explantes/BIT. El volumen de medio de cultivo por explante se determinó siguiendo la relación de 1 explante/200 ml, propuesto por Escalona *et al.* (1999).

* Explante, en un sistema de inmersión temporal consideraremos a aquellas plántulas entre 2 a 3 cm, con dos a tres brotes.

** Unidad BIT (biorreactor de inmersión temporal), estuvo conformada por los recipientes encargados de contener el medio y el material vegetal con sus respectivas mangueras y filtros.

4.2.10. Diseño experimental

El Diseño Completamente al Azar (D.C.A.), con 3 tratamientos en estudio y cada tratamiento con 3 repeticiones u observaciones (cuadro 4). En cada repetición se evaluó 7, 10 y 13 explantes, siendo un total de 21, 30 y 39 plántulas evaluadas por tratamiento respectivamente. La unidad experimental (U.E.) estuvo constituida por 1 unidad BIT (1 botella conteniendo los explantes + 1 botella para el medio líquido).

**Cuadro 4: Repeticiones, densidad de inóculo (número de explantes/BIT),
tratamientos**

Repeticiones	Número de explantes/BIT	Tratamientos
I	7	T ₁
	10	T ₂
	13	T ₃
II	7	T ₁
	10	T ₂
	13	T ₃
III	7	T ₁
	10	T ₂
	13	T ₃

4.2.11. Variables evaluadas

Después de 16 semanas de cultivo, se evaluó las siguientes variables:

a) Contaminación

La presencia de microorganismos se evaluó por observación directa (foto 28), después de transcurrir 7 días a partir de la introducción de explantes al sistema de inmersión temporal. Para luego

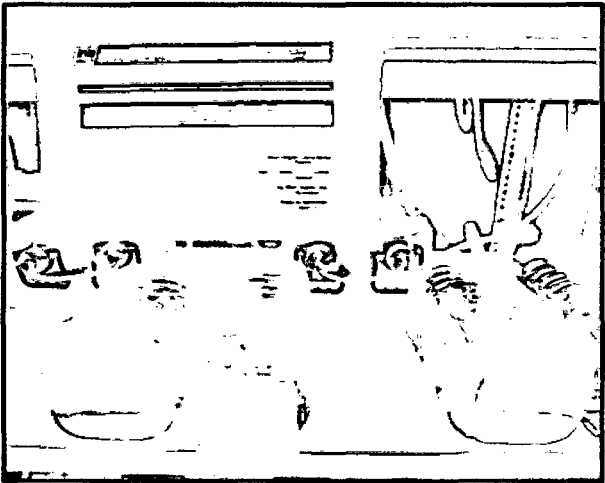


Foto 28: BIT's en estado aséptico

realizarse el conteo necesario y obtener el porcentaje de contaminación para cada tratamiento; utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ contaminación} = \frac{\text{Unidades BIT contaminadas}}{\text{Total de unidades BIT}} \times 100$$

b) Número de plántulas obtenidas por tratamiento

Se determinó después de haber cultivado por 16 semanas los brotes iniciales, mediante conteo de las plantas obtenidas.

c) Número de plántulas según clase por tratamiento

Después de haber determinado la altura de las plantas, las agrupamos en clases (A: 12-8 cm, B: 4-8 cm, C: 0-4 cm) tal como muestra la foto 29, siguiendo una metodología similar propuesta por Escalona *et al.* (1999).



Foto 29: Plantas según clase

d) Altura de las plántulas obtenidas por tratamiento

Se evaluó después de 16 semanas, para este parámetro fue necesario utilizar papel milimetrado (foto 30 y 31).



Foto 30: Determinando altura de planta



Foto 31: Plantas con diferentes alturas

e) Supervivencia (Plántulas sembradas Vs. Plántulas aclimatadas según clase)

Después de 16 semanas, las plantas obtenidas en los BIT's se sembraron en su respectivo sustrato considerándose el 100% de estas. Este parámetro se evaluó a los 21 días después de haber realizado la siembra (foto 32, 33 y 34).

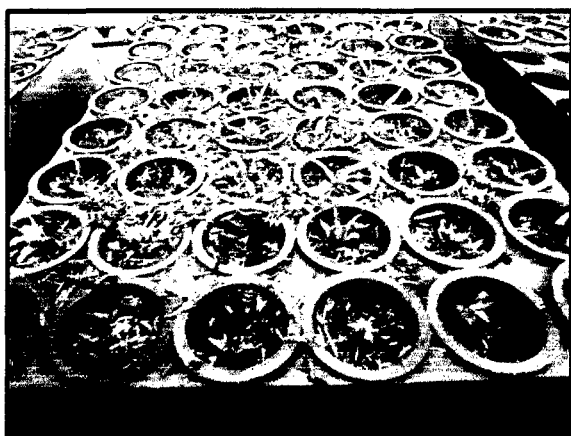


Foto 32: Plantas clase C (después de 21 días)

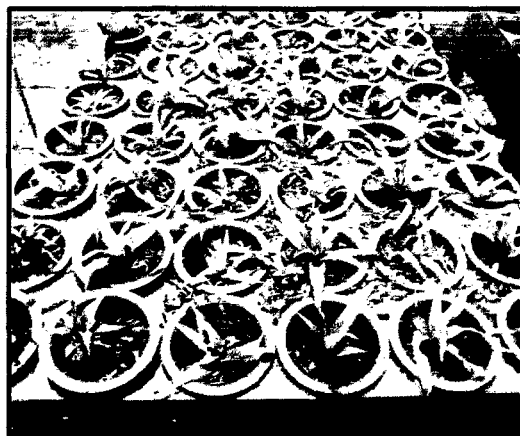


Foto 33: Plantas clase B (después de 21 días)



Foto 34: Plantas clase A (después de 21 días)

Para determinar la supervivencia al trasplante en condiciones de vivero, se consideró las clases (A: 12-8 cm, B: 4-8 cm, C: 0-4 cm) anteriormente descritas, mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ Supervivencia} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de plántulas aclimatadas}}{\text{N}^{\circ} \text{ de plántulas sembradas}} \times 100$$

V. RESULTADOS

5.1 De la contaminación

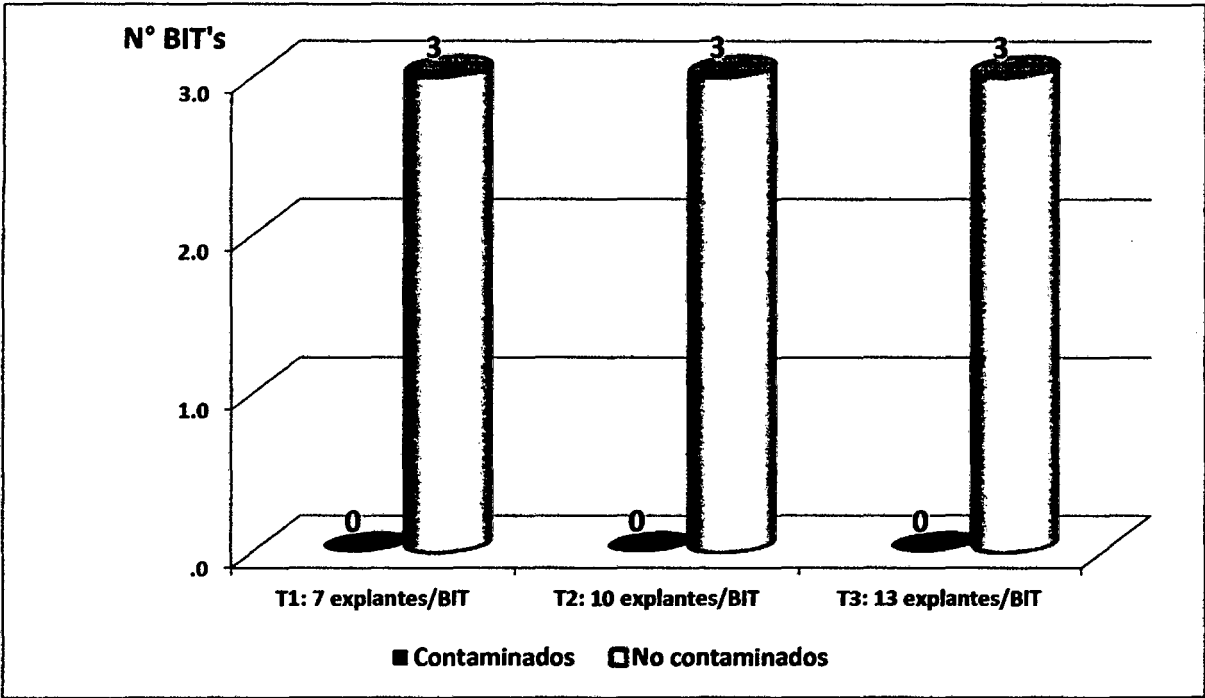


Gráfico 1: Número de BIT's contaminados según tratamientos

.....

5.2 Del número de plántulas obtenidas por tratamiento

Cuadro 5: Análisis de varianza para el Número de plántulas obtenidas (datos transformados por \sqrt{x})

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L.	Media cuadrática	F.C.	Sig. Del P-valor
Tratamientos	50,889	2	25,444	14,312	0,005 **
Error experimental	10,667	6	1,778		
Total	61,556	8			

$R^2 = 82,7\%$

C.V. = 8,33 %

Promedio = 16,0

**Significativo $\alpha = 0,01$

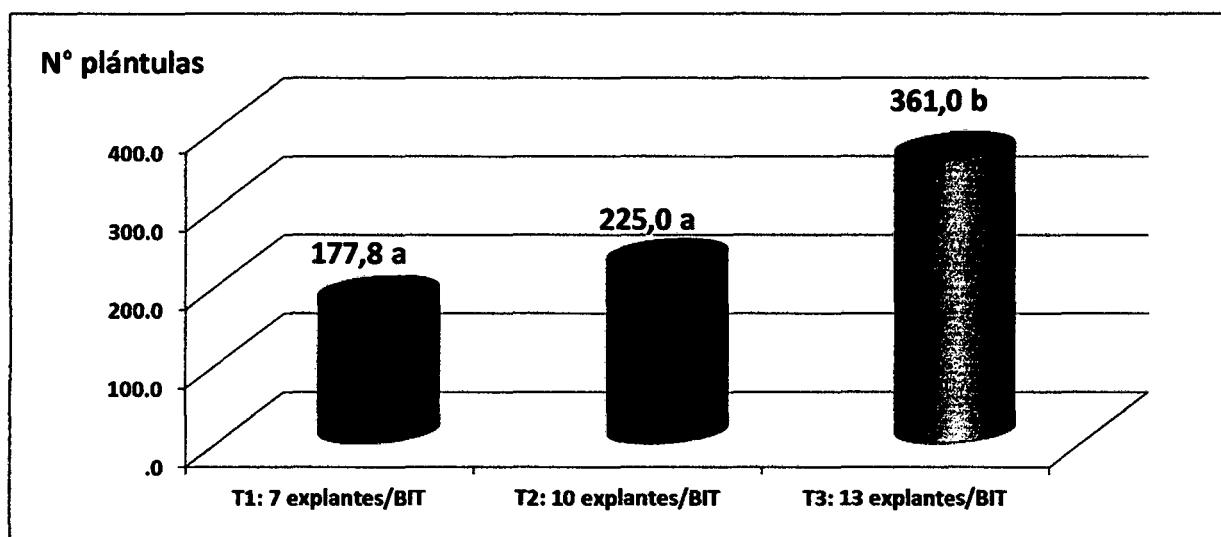


Gráfico 2: Prueba múltiple de Duncan ($\alpha = 0,05$) para los promedios de tratamientos respecto al número de plántulas obtenidas

5.3. Del Número de plántulas Clase A (8-12 cm)

Cuadro 6: Análisis de varianza para el Número de plántulas Clase A (8-12 cm) (datos transformados por \sqrt{x})

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L.	Media cuadrática	F.C.	Sig. Del P-valor
Tratamientos	0,905	2	0,453	11,191	0,009 **
Error experimental	0,243	6	0,040		
Total	1,148	8			

$R^2 = 78,9\%$

C.V. = 13,79 %

Promedio = 1,45

**Significativo $\alpha = 0,01$

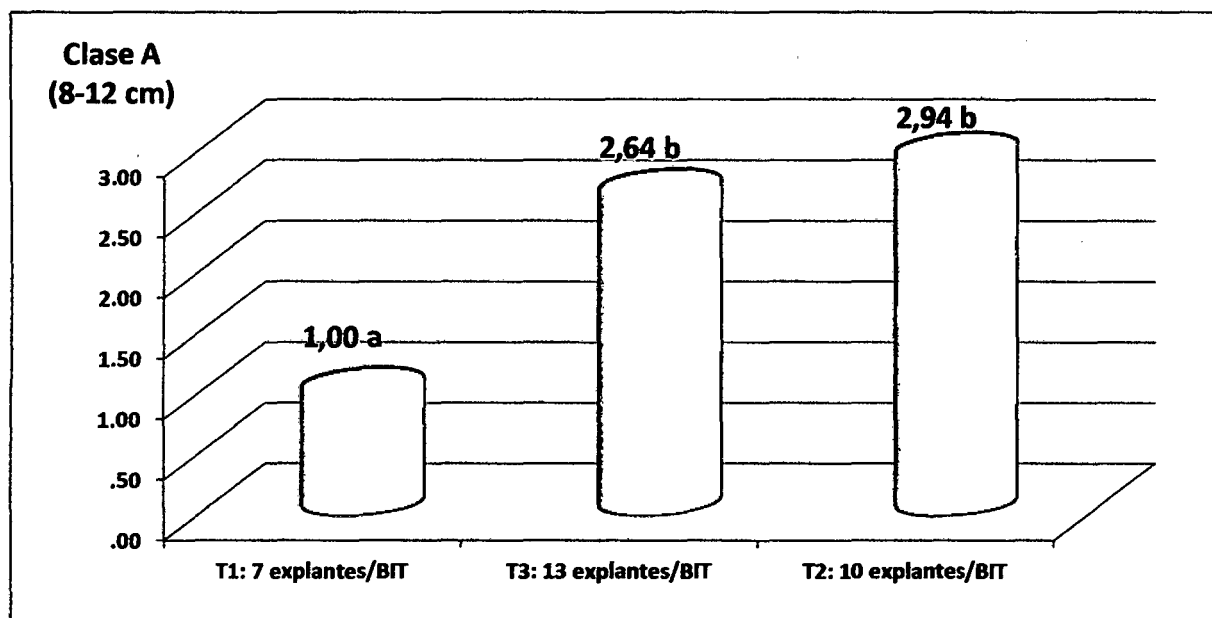


Gráfico 3: Prueba múltiple de Duncan ($\alpha = 0,05$) para los promedios de tratamientos respecto al Número de plántulas Clase A (8-12 cm)

5.4. Del Número de plántulas Clase B (4 -8 cm)

Cuadro 7: Análisis de varianza para el Número de plántulas Clase B (4 -8 cm) (datos transformados por \sqrt{x})

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L.	Media cuadrática	F.C.	Sig. Del P-valor
Tratamientos	0,124	2	0,062	6,643	0,030 *
Error experimental	0,056	6	0,009		
Total	0,180	8			

$R^2 = 69.0\%$

C.V. = 4,03 %

Promedio = 2,35

*Significativo $\alpha = 0,05$

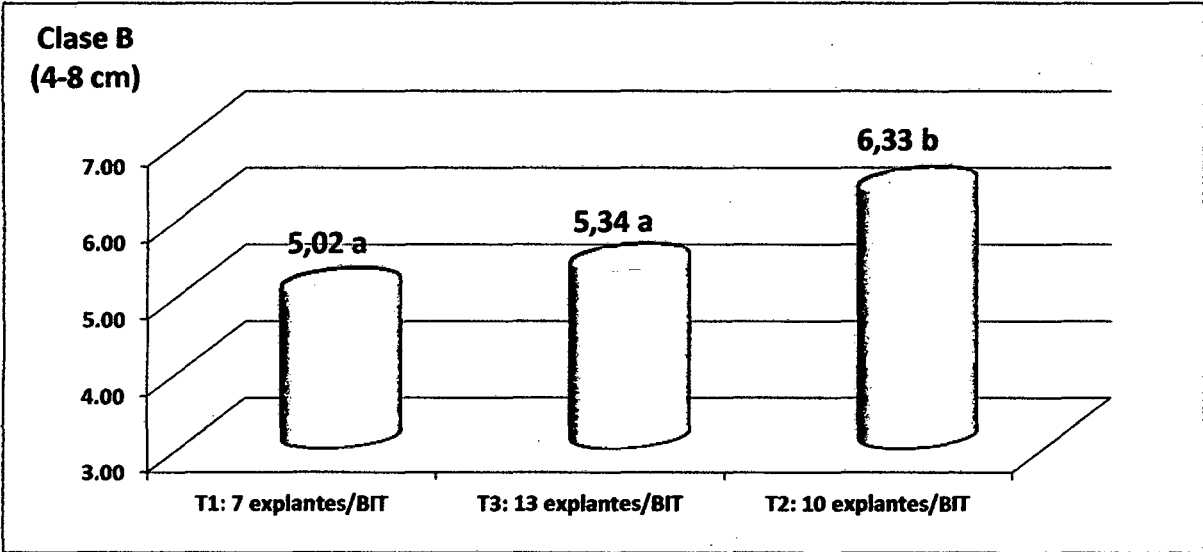


Gráfico 4: Prueba múltiple de Duncan ($\alpha = 0,05$) para los promedios de tratamientos respecto al Número de plántulas Clase B (4 - 8 cm)

5.5. Del Número de plántulas Clase C (0-4 cm)

**Cuadro 8: Análisis de varianza para el Número de plántulas Clase C (0-4 cm)
(datos transformados por \sqrt{x})**

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L.	Media cuadrática	F.C.	Sig. Del P-valor
Tratamientos	1,100	2	0,550	28,228	0,001 **
Error experimental	0,117	6	0,019		
Total	1,216	8			

R² = 90,4%

C.V. = 9,3%

Promedio = 1,48

****Significativo $\alpha = 0,01$**

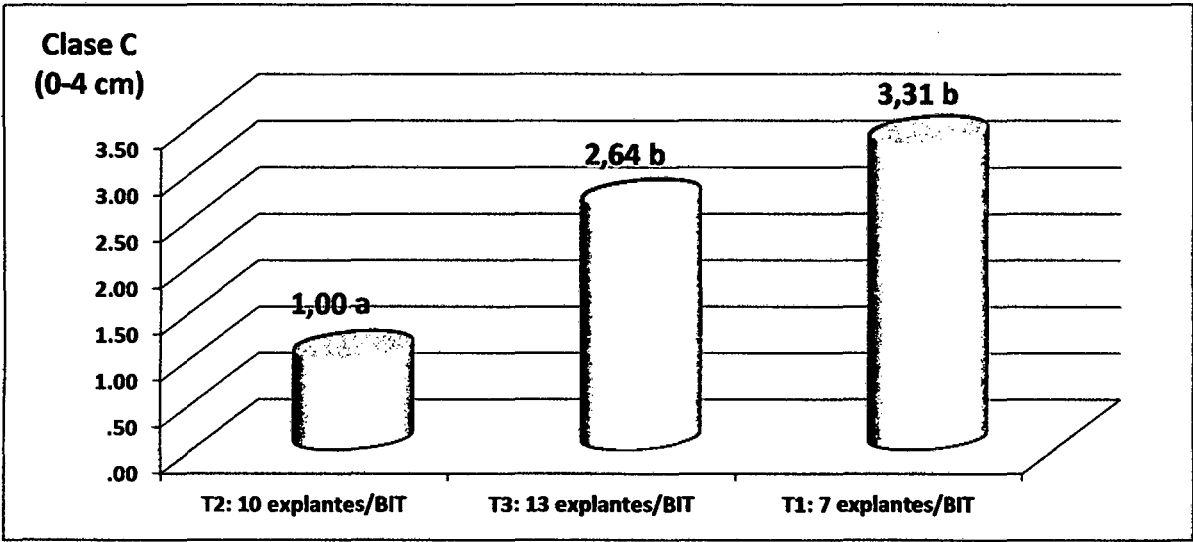


Gráfico 5: Prueba múltiple de Duncan ($\alpha = 0,05$) para los promedios de tratamientos respecto al Número de plántulas Clase C (0 - 4 cm)

5.6. De la Altura de plántulas obtenidas por tratamiento

Cuadro 9: Análisis de varianza para la Altura (cm) de plántulas obtenidas

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L.	Media cuadrática	F.C.	Sig. Del P-valor
Tratamientos	2,360	2	1,180	10,993	0,010 *
Error experimental	0,644	6	0,107		
Total	3,004	8			

$R^2 = 78,6\%$

C.V. = 5,53 %

Promedio = 5,91

*Significativo $\alpha = 0,05$

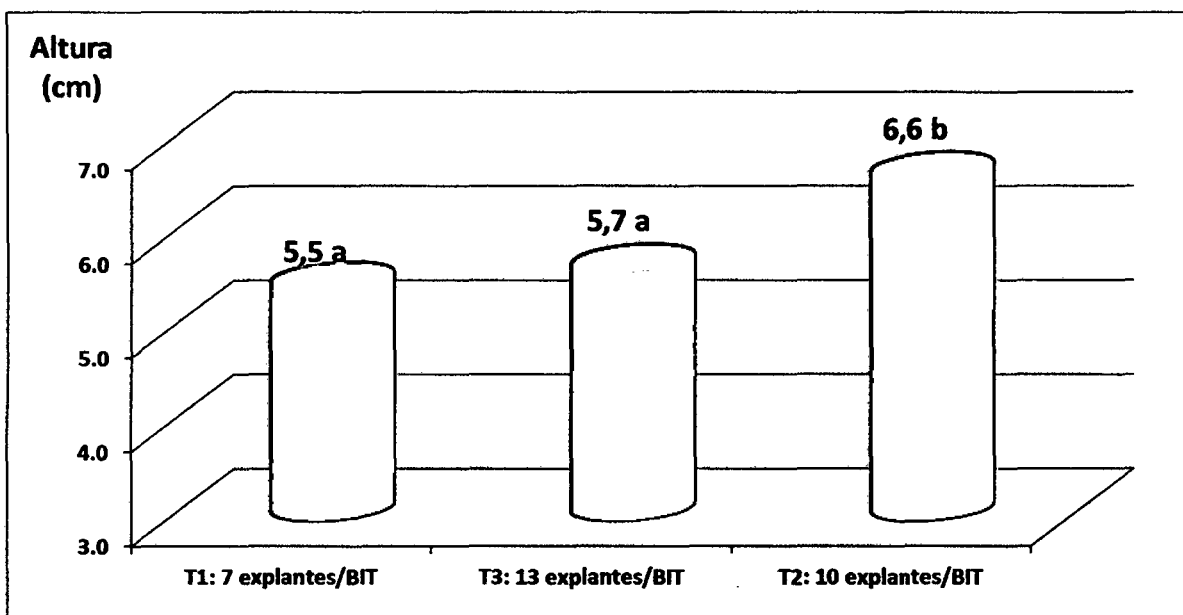


Gráfico 6: Prueba múltiple de Duncan ($\alpha = 0,05$) para los promedios de tratamientos respecto a la altura de plántulas obtenidas

5.7. Supervivencia (Plántulas sembradas Vs. Plántulas aclimatadas según Clase)

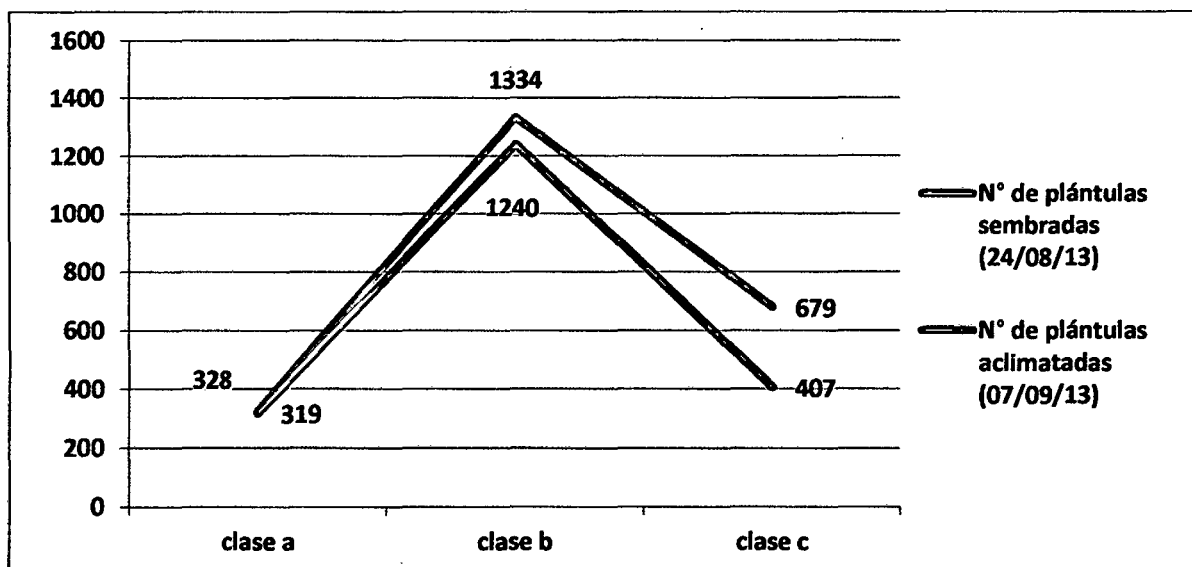


Gráfico 7: Número de plántulas sembradas Vs. Numero de plántulas aclimatadas según clase

VI. DISCUSIONES

6.1. Contaminación

En el gráfico 1, se observa que del total de 9 unidades BIT instaladas en el estudio de los tratamientos, el T1 (7 explantes/BIT) con 3 unidades BIT obtuvo un porcentaje de no contaminados igual a 100,00% (3), en el T2 (10 explantes/BIT) con 3 unidades BIT instaladas se obtuvo un 100,00% (3) de no contaminados y lo mismo ocurrió de las 3 unidades BIT correspondientes al T3 (13 explantes/BIT) un 100,00% (3) no se contaminó. Estos resultados, se pueden atribuir al efecto que tuvo el esterilizante químico denominado G-1 sobre la inhibición de hongos y bacterias, al mantener las unidades de cultivo en estado aséptico después de la inoculación de los explantes, período crítico y decisivo para mantener la calidad del proceso, tal como dice <http://www.imciencia.com/index.php>, que al referirse sobre la calidad en el proceso de producción de una biofábrica, esta se debe entender por: % de contaminación (por hongos y bacterias).

La acción biológica como bactericida de amplio espectro y fungicida del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitro-vinil)-furano (denominado G-1), se demostró basándose en estos principios, y dando consideración al gráfico 1, se observa que los porcentajes de contaminación del total de unidades BIT se mantuvo en un 100,00%, además se presume que las actividades concernientes al proceso de inoculación fueron realizadas bajo normas de inocuidad, corroborado por Hernández *et al.*, (2006).

La eficiente acción del G-1 sobre los microorganismos contaminantes se pudo lograr con una dosis de 0, 114 g/L tal como muestra el anexo 3, sin causar fitotoxicidad o afectar la capacidad morfogénica de los brotes de piña en BIT, resultados contradictorios según Hernández *et al.*, (2006) y Fundora *et al.*, (2007), donde recomiendan dosis entre 28 y 40 mg/L e incluso se podría prescindir de la esterilización por autoclave del medio.

Delgado (2004), en un estudio similar sobre *Ananas comosus*, realizado bajo técnicas convencionales alcanzo un promedio de contaminación de 26,67%, al esterilizar el medio de cultivo en autoclave, resultado poco eficiente si comparamos los métodos de esterilización empleados con el resultado que muestra el gráfico 1.

6.2 Del número de plántulas obtenidas

El análisis de varianza para el número de plántulas (cuadro 5) detectó diferencias altamente significativas al 99% para la fuente de variabilidad tratamientos, así mismo, el Coeficiente de Determinación (R^2) explica en un 82,7% los efectos que han tenido los tratamientos estudiados sobre el número de plántulas. Por otro lado, el Coeficiente de Variabilidad (C.V.) con un valor de 8,33% se encuentra por encima del máximo permisible para trabajos de investigación realizados en laboratorio, tal como lo indica Calzada (1982).

La prueba múltiple de Duncan ($\alpha = 0,05$) para los promedios de tratamientos (gráfico 2), también ha detectado diferencias significativas entre los promedios de tratamientos, donde el T3 (13 explantes/BIT) obtuvo el mayor promedio

con 361 plántulas, superando estadísticamente a los tratamientos T2 (10 explantes/BIT) y T1 (7 explantes/BIT) quienes obtuvieron promedios de 224,0 y 177,8 plántulas, esto nos indica como se vio afectada la tasa de multiplicación para los tratamientos al considerar tres densidades de inóculo (cuadro 4) y como el número de plantas obtenidas está relacionado con el número de explantes/BIT. Al determinar la tasa de multiplicación (Plantas obtenidas/Número de explantes: $2341/90$) esta nos dio un valor igual a 26, como consecuencia del principio de funcionamiento del SIT, al facilitar una mayor incorporación y asimilación de los nutrientes por los tejidos e incrementar notablemente la oxigenación del medio, tal como citan <http://www.ecured.cu/index.php>, y Mulet *et al.*, (1999), con la finalidad de producir plantas en grandes cantidades y en condiciones para la aclimatización.

Respecto a la tasa o índice de multiplicación obtenido este se asume como favorable para lograr el fin en el proceso de micropropagación de plantas mediante SIT, guardando relación con lo mencionado por Ministerio de Agricultura – FIA (2004), Ángel y Gonzáles (2013), Basail *et al.*, (2012), Espinosa *et al.*, (2007) y Escalona *et al.*, (1999), quienes indican que para lograr la eficacia en el cultivo, es necesario tener en cuenta la interacción entre el tiempo y frecuencia de inmersión, tipo y densidad de inóculo, volumen de medio de cultivo, tiempo de proliferación, condiciones de cultivo, genotipo y uso de retardantes del crecimiento, factores que se tuvieron en cuenta para favorecer la multiplicación de brotes. Sin embargo Delgado (2004), obtuvo una tasa de multiplicación igual a 16,8 atribuyendo este resultado al estímulo

de las citoquininas sobre la división celular y la formación de vástagos adventicios pues no tuvo que considerar todos los factores arriba mencionados al tratarse de la propagación *in vitro* mediante procedimientos convencionales.

Además se puede deducir que la alta proliferación de brotes, fue debido a la relación de los reguladores del crecimiento (auxina/citoquinina) en el medio de cultivo utilizado en la fase de multiplicación y a la asimilación de nutrientes, pues el crecimiento celular está en estrecha relación con la nutrición, sumado a esto el efecto de estímulos ambientales o condiciones de cultivo. De acuerdo a la relación auxina/citoquinina, el efecto de su interacción a nivel fisiológico fue preponderante sobre la diferenciación y división celular, inducción de la morfogénesis, inversión de la dominancia apical, tal como lo indican Barceló *et al.* (2001), Pierik (1987), Roca y Mroginski (1991).

6.3. Del Número de plántulas Clase A (8-12 cm)

El análisis de varianza para el número de plántulas obtenidas clase A (8-12 cm) (cuadro 6) detectó diferencias altamente significativas al 99% para la fuente de variabilidad tratamientos, así mismo, el Coeficiente de Determinación (R^2) explica en un 78,9% los efectos que han tenido los tratamientos estudiados sobre el número de plántulas obtenidas. Por otro lado, el Coeficiente de Variabilidad (C.V.) con un valor de 13,79% se encuentra ligeramente elevado sobre el máximo permisible para trabajos de investigación realizados en laboratorio, tal como lo indica Calzada (1982).

La prueba múltiple de Duncan ($\alpha = 0,05$) para los promedios de tratamientos (gráfico 3), también ha detectado diferencias significativas entre los promedios de tratamientos, donde el T2 (10 explantes/BIT) obtuvo el mayor promedio con 2,94 siendo este estadísticamente igual al T3 (13 explantes/BIT) quien obtuvo un promedio de 2,64 siendo estos tratamientos distintos al T1 (7 explantes/BIT) quien obtuvo un promedio de 1,00. Este resultado nos indica que la adecuada densidad de inóculo se manifestó en el T2 (10 explantes/BIT) debido a la influencia positiva del SIT sobre el crecimiento y multiplicación de las plantas, Mulet *et al.*, (1999).

De acuerdo al gráfico 3, nos indica que el mayor promedio de plantas para la clase A (8-12 cm) se vio favorecido por las el número de explantes en relación al volumen del envase de cultivo, proporcionando a los explantes una mayor interceptación de luz y asimilación de nutrientes, corroborado por Ministerio de Agricultura – FIA (2004), Ángel y Gonzáles (2013), Basail *et al.*, (2012), Espinosa *et al.*, (2007), Escalona *et al.*, (1999). Encontrándose que densidades inferiores al T2 (10 explantes/BIT) disminuyen la calidad de las plantas.

La acción fisiológica de citoquininas y giberelinas utilizados en el medio de cultivo para la fase de elongación estimulo la diferenciación, entonces el crecimiento pudo efectuarse en cada una de las regiones de la planta que contribuyen al crecimiento longitudinal (el meristemo apical, el subapical y la zona de elongación), y lograr plantas uniformes, citado por Barceló *et al.*, (2001), Pierik (1987), Roca y Mroginski (1991).

6.4. Del Número de plántulas Clase B (4 -8 cm)

El análisis de varianza para el número de plántulas clase B (4 -8 cm) (cuadro 7) detectó diferencias significativas al 95% para la fuente de variabilidad tratamientos, así mismo, el Coeficiente de Determinación (R^2) explica en un 69,0% los efectos que han tenido los tratamientos estudiados sobre el número de plántulas clase B (4 - 8 cm). Por otro lado, el Coeficiente de Variabilidad (C.V.) con un valor de 4,03% se encuentra dentro del rango permisible para trabajos de investigación realizados en laboratorio, tal como lo indica Calzada (1982).

La prueba múltiple de Duncan ($\alpha = 0,05$) para los promedios de tratamientos (gráfico 4) también ha detectado diferencias significativas entre los promedios de tratamientos, donde el T2 (10 explantes/BIT) obtuvo el mayor promedio con 6,33 superando estadísticamente a los tratamientos T3 (13 explantes/BIT) y T1 (7 explantes/BIT) quienes obtuvieron promedios de 5,34 y 5,02 respectivamente. Este resultado corrobora que la adecuada densidad de inóculo se manifestó en el T2 (10 explantes/BIT) debido a la influencia positiva del SIT sobre el crecimiento y multiplicación de las plantas, Mulet *et al.*, (1999).

El mayor promedio de plantas para la clase B (8-12 cm) según el gráfico 4, nos indica que se vio favorecido por las el número de explantes en relación al volumen del envase de cultivo, proporcionando a los explantes una mayor interceptación de luz y asimilación de nutrientes, corroborado por Ministerio de Agricultura – FIA (2004), Ángel y Gonzáles (2013), Basail *et al.*, (2012),

Espinosa *et al.*, (2007), Escalona *et al.*, (1999). Encontrándose que densidades inferiores o superiores al T2 (10 explantes/BIT) disminuyen la calidad de las plantas.

La acción fisiológica de citoquininas y giberelinas utilizados en el medio de cultivo para la fase de elongación estimulo la diferenciación, entonces el crecimiento pudo efectuarse en cada una de las regiones de la planta que contribuyen al crecimiento longitudinal (el meristemo apical, el subapical y la zona de elongación), favorecido por las condiciones de cultivo que en consecuencia se logró plantas uniformes y en mayor proporción respecto a la clase A y C, citado por Barceló *et al.*, (2001), Pierik (1987), Roca y Mroginski (1991).

6.5. Del Número de plántulas Clase C (0-4 cm)

El análisis de varianza para el número de plántulas clase B (0 – 4 cm) (cuadro 8) detectó diferencias altamente significativas al 99% para la fuente de variabilidad tratamientos, así mismo, el Coeficiente de Determinación (R^2) explica en un 90,04% los efectos que han tenido los tratamientos estudiados sobre el número de plántulas clase C (0 – 4 cm). Por otro lado, el Coeficiente de Variabilidad (C.V.) con un valor de 9,3% se encuentra por encima del rango permisible para trabajos de investigación realizados en laboratorio, tal como lo indica Calzada (1982).

La prueba múltiple de Duncan ($\alpha = 0,05$) para los promedios de tratamientos (gráfico 5) también ha detectado diferencias significativas entre los promedios

de tratamientos, donde los tratamientos T1 (7 explantes/BIT) y T3 (13 explantes/BIT) obtuvieron los mayores promedios con 3,31 y 2,64 plántulas de la clase C (0-4 cm), superando estadísticamente al tratamiento T2 (10 explantes/BIT) quien obtuvo el promedio más bajo con 1,00. De acuerdo a este resultado corrobora que la adecuada densidad de inóculo se manifestó en el T2 (10 explantes/BIT) debido a la influencia positiva del SIT sobre el crecimiento y multiplicación de las plantas, Mulet *et al.*, (1999).

Según el gráfico 5, el promedio de plantas más bajo en la clase B (8-12 cm) fue para el T2 (10 explantes/BIT), atribuyéndose este resultado al número de explantes en relación al volumen del envase de cultivo, proporcionando a los explantes una mayor interceptación de luz y asimilación de nutrientes, corroborado por Ministerio de Agricultura – FIA (2004), Ángel y Gonzáles (2013), Basail *et al.*, (2012), Espinosa *et al.*, (2007), Escalona *et al.*, (1999). Encontrándose que densidades inferiores o superiores al T2 (10 explantes/BIT) disminuyen la calidad de las plantas.

La acción fisiológica de citoquininas y giberelinas utilizados en el medio de cultivo para la fase de elongación estimulo la diferenciación, entonces el crecimiento pudo efectuarse en cada una de las regiones de la planta que contribuyen al crecimiento longitudinal (el meristemo apical, el subapical y la zona de elongación), favorecido por las condiciones de cultivo al obtener una menor proporción de plantas clase C respecto a la clase B, citado por Barceló *et al.*, (2001), Pierik (1987), Roca y Mroginski (1991).

6.6. De la Altura de plántulas obtenidas

El análisis de varianza para la altura de plántulas obtenidas (cuadro 9) detectó diferencias significativas al 95% para la fuente de variabilidad tratamientos, así mismo, el Coeficiente de Determinación (R^2) explica en un 78,6% los efectos que han tenido los tratamientos estudiados sobre la altura de plántulas. Por otro lado, el Coeficiente de Variabilidad (C.V.) con un valor de 5,53% se encuentra dentro del rango permisible para trabajos de investigación realizados en laboratorio, tal como lo indica Calzada (1982).

La prueba múltiple de Duncan ($\alpha = 0,05$) para los promedios de tratamientos (gráfico 6) también ha detectado diferencias significativas entre los promedios de tratamientos, donde el T2 (10 explantes/BIT) obtuvo el mayor promedio con 6,6 cm de altura de plántulas, superando estadísticamente a los tratamientos T3 (13 explantes/BIT) y T1 (7 explantes/BIT) quienes obtuvieron promedios de 5,7 y 5,5 cm de altura de plántulas respectivamente. Este resultado corrobora que la adecuada densidad de inóculo se manifestó en el T2 (10 explantes/BIT) debido a la influencia positiva del SIT sobre el crecimiento y multiplicación de las plantas, concertando con lo mencionado por Mulet *et al.*, (1999).

El mayor promedio de altura de plantas para el T2 (10 explantes/BIT) según el gráfico 6, nos indica que se vio favorecido por el número de explantes en relación al volumen del envase de cultivo, proporcionando a los explantes una mayor interceptación de luz y asimilación de nutrientes, renovación total de la atmósfera de cultivo en cada inmersión (intercambio de gases) y el efecto

comunitario de los grupos de brotes o clusters, corroborado por Teisson y Alvard (1995), Ministerio de Agricultura – FIA (2004), Ángel y Gonzáles (2013), Basail *et al.*, (2012), Espinosa *et al.*, (2007), Escalona *et al.*, (1999). Encontrándose que densidades inferiores o superiores al T2 (10 explantes/BIT) disminuyen la calidad de las plantas.

La acción fisiológica de citoquininas y giberelinas utilizados en el medio de cultivo para la fase de elongación estimulo la diferenciación, entonces el crecimiento pudo efectuarse en cada una de las regiones de la planta que contribuyen al crecimiento longitudinal (el meristemo apical, el subapical y la zona de elongación), la adición de endospermo líquido de coco (20%) al medio en la fase de enraizamiento favoreció una mayor altura en las plantas, además las condiciones de cultivo, el número y tiempo de subcultivo realizados ayudaron a lograr plantas uniformes, citado por Barceló *et al.*, (2001), Pierik (1987), Roca y Mroginski (1991).

6.7. De las Plántulas sembradas Vs. Plántulas aclimatadas según clase

En el gráfico 7, se puede observar que del total de plántulas sembradas (328) de la clase A, un 97,25% (319) se llegaron a aclimatar, así mismo, las plántulas sembradas de la clase B fueron 1334 y de los cuales un 92,95% (1240) se aclimataron y de las 679 plántulas sembradas de la clase C se aclimataron un 59,94% (407). Es evidente que las plántulas de la clase A, son las que se aclimataron en mayor porcentaje (97,25%). Según los datos presentados en el gráfico 7, hacen alusión que plantas pertenecientes a la clase C (0-4 cm) no son competentes por tanto no tuvieron éxito en la

aclimatación, y requerirían de otros tratamiento ex vitro para su normal aclimatación

Es evidente que la densidad de inóculo y el periodo de 16 semanas para la formación de plantas a partir de la inoculación en el SIT alcanzo el más alto número de plantas de buena calidad y competentes para el enraizamiento ex vitro y aclimatación, corroborado por Escalona *et al.*, (1999), Ángel y Gonzáles (2013), quedando demostrado que las plántulas de clase A y B podrían ser cultivadas directamente en invernadero obteniendo una supervivencia entre 92,95% y 97,25% respectivamente, resultados similares fueron obtenidos por Delgado (2004) y Mas (2013), asumiendo que las plantas no aclimatadas fueron pequeñas o lesionadas durante el proceso de aclimatación, mas no por efectos fisiológicos de este proceso.

Según el gráfico 7, se deduce que a través de la utilización del sistema de inmersión temporal en la micropropagación de plantas se puede lograr altos porcentajes de supervivencia en la aclimatación, al lograr plantas que poseen laminas foliares serosas comparadas con las plantas húmedas de la propagación convencional, según lo citado por <http://www.imciencia.com/index.php>, por tanto la deshidratación es menor en las plantas provenientes de estos sistemas durante aclimatación.

En la fase de enraizamiento la adición de endospermo liquido de coco al 20% al medio de cultivo (anexo 5) no tuvo mayor significancia para tal fin, sin embargo se obtuvieron altos porcentajes de supervivencia para las plantas de

clase A y B, atribuyendo este resultado al efecto favorable del SIT, por tanto se puede prescindir de la fase de enraizamiento en la micropropagación de piña mediante SIT pudiendo realizar en condiciones *ex vitro* (foto 35) corroborado por <http://www.imciencia.com/index.php>, Escalona *et al.*, (1999), Ángel y Gonzáles (2013), además la rusticidad de *Ananas comosus* ayuda en el proceso de aclimatación y el enraizamiento se puede realizar *ex vitro*, basándose en lo citado por Mohammed y Vidaver (1990), al mencionar que la presencia de raíces solo es necesario en plantas leñosas pues les garantiza alta supervivencia en la aclimatización.

Además teniendo en consideración lo descrito por Escalona *et al.* (1999), se puede asumir que mediante un esquema de producción (anexo 8 y 9), es posible obtener aproximadamente 90 brotes de 5 yemas axilares de corona en alrededor de 9 semanas a través de métodos convencionales, y al término de 16 semanas después de la inoculación en los biorreactores de inmersión temporal se logró producir 2,341 plantas.

6.8. De los costos de producción.

En los anexos 9, 10 y 11 se muestran los costos relacionados con la producción de las plantas producidas mediante el sistema de inmersión temporal (S/.734.07) y mediante procedimientos convencionales (S/.1,001) basados en 2,300 plantas, demostrándose que el menor costo de producción fue obtenido por la micropropagación mediante SIT.

El procedimiento de propagación mediante SIT puede reducir hasta en un 27% los costos de producción por planta en comparación con el método convencional tal como lo muestran los anexos 9 y 10. Esto se debe a la eficiencia y duración del procedimiento habiéndose superado un factor importante en el aumento de los costos de producción para la propagación convencional, representado por el costo de la mano de obra en todo el proceso de producción, pues el SIT reduce considerablemente este factor al no demandar de constantes subcultivos.

VII. CONCLUSIONES

- 7.1. El protocolo establecido en este trabajo de investigación, permitió que en el T1 (7 explantes/BIT) se obtuviera un porcentaje de no contaminados igual a 100,00% (3), en el T2 (10 explantes/BIT) obtuvo un 100,00% (3) de no contaminados y lo mismo ocurrió con el T3 (13 explantes/BIT) un 100,00% (3) de no contaminados, demostrando la eficacia de los procedimientos determinados tanto en la introducción de explantes al BIT, multiplicación, elongación y enraizamiento de las plántulas.
- 7.2. El T3 (13 explantes/BIT) obtuvo el mayor promedio con 361 plántulas, superando estadísticamente a los tratamientos T2 (10 explantes/BIT) y T1 (7 explantes/BIT) quienes obtuvieron promedios de 225,0 y 177,8 plántulas.
- 7.3. El T2 (10 explantes/BIT) obtuvo el mayor promedio con 2,94 plántulas, siendo este estadísticamente igual al T3 (13 explantes/BIT) quien obtuvo un promedio de 2,64 plántulas de clase A (8-12 cm), siendo estos tratamientos distintos al T1 (7 explantes/BIT) quien obtuvo un promedio de 1,00.
- 7.4. El T2 (10 explantes/BIT) obtuvo el mayor promedio con 6,33 plántulas de clase B (4-8 cm), superando estadísticamente a los tratamientos T3 (13 explantes/BIT) y T1 (7 explantes/BIT) quienes obtuvieron promedios de 5,34 y 5,02 respectivamente.

- 7.5. Los tratamientos T1 (7 explantes/BIT) y T3 (13 explantes/BIT) obtuvieron lo mayores promedios con 3,31 y 2,64 plántulas de la clase C (0-4 cm), superando estadísticamente al tratamiento T2 (10 explantes/BIT) quien obtuvo el promedio más bajo con 1,00.
- 7.6. El T2 (10 explantes/BIT) obtuvo el mayor promedio con 6,6 cm de altura de plántulas, superando estadísticamente a los tratamientos T3 (13 explantes/BIT) y T1 (7 explantes/BIT) quienes obtuvieron promedios de 5,7 y 5,5 cm de altura de plántulas respectivamente.
- 7.7. Del total de plántulas sembradas (328) de la clase A, un 97,25% (319) se llegaron a aclimatar, así mismo, las plántulas sembradas de la clase B fueron 1334 y de los cuales un 92,95% (1240) se aclimataron y de las 679 plántulas sembradas de la clase C se aclimataron un 59,94% (407). Es evidente que las plántulas de la clase A, son las que se aclimataron en mayor porcentaje (97,25%).

VIII. RECOMENDACIONES

- 8.1.** Utilizar una adecuada densidad de inóculo para obtener grandes cantidades de plantas y con un promedio de altura aceptable, siendo el T3 (13 explantes/BIT) el que obtuvo el mayor promedio con 361 plántulas.
- 8.2.** El T2 (10 explantes/BIT) obtuvo el mayor promedio con 6,6 cm de altura de plántulas después de las 16 semanas de cultivo.
- 8.3.** Lograr plantas de clase A (8-12 cm) y B (4-8 cm) al considerarlas como las más competentes para la aclimatación.
- 8.4.** Al evidenciar los porcentajes de no contaminación obtenidos, se hace necesario la utilización de productos esterilizantes como el G-1, en los proceso de producción de vitroplantas.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Almeida, W., Matos, A., Souza, A. (1997). Effects of benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* proliferation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). *Acta Horticulturae* 425, 5 p.
2. Almeida, W., Silva, G.; Martineli, A.; Pereira, M. (2002). Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, São Paulo, v. 24.
3. Ángel, J., Gonzáles, J. (2013). Evaluación de dos métodos de micropropagación masal en piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) variedad golden. Tesis para optar el título de ingeniero agrónomo. Universidad de El Salvador, 112 p.
4. Barceló, J., Nicolás, G., Sabater, B., Sánchez, R. (2001). *Fisiología vegetal*. Ed. Pirámide, Madrid-España, 713 p.
5. Basail, M., Medero, V., Otero, E., Torres, M., López, J., Cabrera, M., Santos, A., Rayas, A., Bauta, M., Beovidez, Y. (2012). Empleo de sistemas de inmersión temporal como alternativa para la multiplicación *in vitro* del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (*Musa* spp., AAB). INIVIT, Villa Clara-Cuba., 5p.
6. Calzada, B. (1982). *Métodos estadísticos para la investigación*. Ed. Milagros S.A. Lima – Perú. 664 p.

7. Delgado, H. (2004). Propagación *in vitro* de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.), utilizando yemas axilares. Tesis para optar el título de ingeniero agrónomo. Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto, 66 p.
8. Drasam (Dirección Regional de Agricultura de San Martín) - DEA. (2012). Serie histórica de la superficie en verde del cultivo de piña. 1 p.
9. Escalona, M.; Lorenzo, J.; Gonzáles, B.; Daquinta, M.; Gonzáles, J.; Desjardins, Y.; Borroto, C. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18: p. 743-748.
10. Espinosa, A., Silva, J., González, O., Fajardo, L., Pérez, J. (2007). Multiplicación *in vitro* de violeta africana (*Saintpaulia ionnata*). Universidad de Granma-Cuba, 7 p.
11. Etienne, H. y Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: p. 215-231.
12. Fitotek, (1994). Fitotek Investigates the Plant Bioreactor. A Challenge to Increase Market Share. BioLink "Agricultural Biotechnology for a Better World". Michigan State University, v. 2, no. 1, 16 p.

13. Fundora, Z., Capote, I., González-Olmedo, J., Castañedo, N., Lovaina, T., Escalona, M. (2007). Empleo de G-1 en la propagación de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en Biorreactores de Inmersión Temporal. Centro de Bioplantas, Ciego de Ávila-Cuba, 7 p.
14. García, D. y Serrano, H. (2005). la piña, *Ananas comosus* (L.) Merr. (Bromeliaceae), algo más que un fruto dulce y jugoso. Universidad Autónoma Metropolitana (UAM - I). Iztapalapa-México, p. 55-61.
15. Gratereaux, W. (2009). Potencial del uso de hongos entomopatógenos para el control de cochinilla (*Dyzmicoccus brevipes*) en producción orgánica de piña (*Ananas comosus*). Tesis para optar el grado de *Magister Scientiae* en Agricultura Ecológica. CATIE. Turrialba, Costa Rica. XV, 66 p.
16. Hernández, R., Guillén, H., Silveira, E., Castañedo, N. (2006). Evaluación postcomercialización de la calidad, seguridad y eficacia del Vitrofurax en cuba. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Villa Clara-Cuba, 10 p.
17. Holdridge, L. (1978). Ecología basada en zonas de vida. IICA. San José – Costa Rica. 216 p.
18. Mas, R. A. (2013). Aclimatación de plántulas de piñón (*jatropha curcas* L.) propagadas *in vitro* en la estación experimental agraria El Porvenir - Juan Guerra. Tesis para optar el título de ingeniero agrónomo. Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto, 148 p.

19. Ministerio de Agricultura – FIA. (2004). Contenido del informe técnico - consultores calificados. Universidad de Talca – Chile, 47 p.
20. Mogollón, N.; Díaz, J.; Hernández, N.; (2004). Multiplicación clonal y enraizamiento *in vitro* de *Ananas comosus* L. "Queen Australia". Rev. Fac. Agron. (Luz). 21 supl. 1, p. 15–21.
21. Mohammed, G. & Vidaver, W. (1990). The influence of acclimatization treatment and plant morphology on early greenhouse-performance of tissue-cultured Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). Plant Tiss. Cult. 21: p. 111-117.
22. Mulet, M., De la Cruz, G., Otero, M., Gonzáles, A., Brito, L., Marañón, M. (1999). Sistema de inmersión temporal automatizado. Tecnología química, v. 19, no. 1, p. 22-24.
23. Newton, G., Haruko, A., Sugitani, J., Portella, A., Rigon, M., Lorenci, A., Biasi, L. and Soccol, R. (2009). Utilization of the Biorreactor of Imersion by Bubbles at the Micropropagation of *Ananas comosus* L. Merril. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 52, p. 37-43.
24. Pac, P. (2005). Experiencias en el cultivo de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) con el híbrido MD2 en finca La Plata, Coatepeque, Quetzaltenango. Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de San Carlos de Guatemala, 48 p.

25. Pierik, R. L. M. (1987). *In Vitro* culture of higher plants. Dordrecht, The Netherlands. Martinus Nijhoff Publishers, 344 p.
26. Roca, W; Mroginski, L. (1991). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. CIAT. Cali, Colombia, p. 2.
27. Sáenz, A. (2007). Referencias técnicas de manejo pre y poscosecha en piña (*Ananas comosus* L. Merrill.) cultivar MD-2. Consejo Nacional de Producción. San José – Costa Rica, 35 p.
28. Segretín, M. (2010). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). ArgenBio, Argentina, 6 p.
29. <http://www.ecured.cu/index.php>. Consultado 08 oct. 2013.
30. <http://www.imciencia.com/index.php>. Consultado 12 oct. 2013.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo de determinar un protocolo eficiente para la micropropagación de *Ananas comusus* (L.) Merr, cultivar MD-2 "Golden", mediante un sistema de inmersión temporal, con la finalidad de determinar el número de explantes que permitan obtener una alta tasa de multiplicación de brotes y de obtener el mayor número de plántulas con la altura suficiente para la etapa de aclimatación. La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental Agraria "El Porvenir" – Tarapoto – INIA, situado en el distrito de Juan Guerra a 14.5 km., de la ciudad de Tarapoto, vía carretera Fernando Belaunde Terry (Tarapoto – Juanjui). Se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA) con tres tratamientos en estudio y cada tratamiento con tres repeticiones u observaciones. En cada repetición se evaluó 7, 10 y 13 explantes, resultando en un total de 21, 30 y 39 plántulas evaluadas por tratamiento respectivamente. La unidad experimental (U.E.) estuvo constituida por una unidad BIT (una botella conteniendo los explantes más una botella para el medio líquido). Después de 16 semanas de cultivo se evaluó las siguientes variables: Contaminación, Número de plantas obtenidas por tratamiento, Número de plántulas según clase por tratamiento, altura de plántulas obtenidas por tratamiento, supervivencia (plántulas sembradas versus plántulas aclimatadas según clase). Los resultados obtenidos indican que el tratamiento T3 (13 explantes/BIT), obtuvo el mayor número promedio de plántulas (361), seguido de los tratamiento T2 y T1, quienes obtuvieron promedios de 225 y 177.8 plántulas, respectivamente. Sin embargo, en el tratamiento T2 con (10 explantes/BIT), obtuvo el mayor promedio de altura de plántulas con 6.6 cm., seguido de los tratamientos T3 y T1, quienes obtuvieron promedios de 5.7 y 5.5 cm de altura de plántulas, respectivamente.

Palabras Claves: Protocolo, micropropagación, inmersión, explantes, tasa, multiplicación, brotes, plántulas.

SUMMARY

This research aimed to determine an efficient protocol for micropropagation of *Ananas comosus* (L.) Merr, growing MD-2 "Golden" through a temporary immersion system, in order to determine the number of explants allow to obtain a high rate of multiplication of shoots and get the largest number of seedlings with high enough for acclimatization stage. The research was conducted at the Laboratory of Plant Biotechnology of the Agricultural Experimental Station "El Porvenir" - Tarapoto - INIA located in the district Juan Guerra 14.5 km from the city of Tarapoto, via highway Fernando Belaunde Terry (Tarapoto - Juanjui). The design was completely randomized (CRD) with three treatments under study and each treatment with three replications or observations. In each iteration we were evaluated 7, 10 and 13 explants, resulting in a total of 21, 30 and 39 seedlings per treatment evaluated respectively. (EU) experimental unit was constituted by a BIT unit (a bottle containing the explants over a bottle for the liquid medium). Pollution, number of plants obtained by treatment, number of seedlings by treatment class, height plantlets per treatment, survival (versus seedlings planted seedlings acclimated according to class): After 16 weeks of culture the following variables were evaluated.

The results indicate that the T3 (13 explants / BIT) treatment had the highest average seedling (361) number, followed by T2 and T1 treatment, who obtained 225 and 177.8 average seedlings, respectively. However, in the treatment T2 (10 explants / BIT), earned the highest average height of seedlings with 6.6 cm., Followed by T3 and T1 treatments, who obtained averages of 5.7 and 5.5 cm seedling, respectively.

Keywords: Protocol, micropropagation, dipping, explants, rate, multiplication, sprouts, seedlings.

ANEXOS

Anexo 1: Componentes del medio de cultivo para la inducción de yemas laterales.

ITEM	Stock	Producto	Fórmula	Concentrac. Stock		Vol. de Stock a preparar (mL)	Pesar		Preparacion	Concentración final en medio de cultivo (g/L)	Cantidad de Stock /L de MS total (en ml)	Cantidad de Stock/L de MS 1/2 (en ml)	
				Cant.	Unid		Cantidad	Unid.					
Macro y micro nutrientes													
1	Stock A	Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	82.50 g/L		500.00	41.2500 g		Disolver en agua destilada y enrazar a 500 mL. CORROSIVO, no pesar en papel aluminio	1.6500	20	10	
2	Stock B	Nitrato de Potasio	KNO ₃	95.00 g/L		500.00	47.5000 g		Disolver en agua destilada y enrazar a 500 mL	1.9000	20	10	
3	Stock C	Cloruro de Calcio dihidratado	CaCl ₂ ·2H ₂ O	88.00 g/L		250.00	22.0000 g		Disolver en agua destilada y enrazar a 250 mL	0.4400	5	2.5	
4	Stock D	Fosfato de Potasio monobasico	KH ₂ PO ₄	34.00 g/L		250.00	8.5000 g		Disolver en agua destilada y enrazar a 250 mL	0.1700	5	2.5	
5	Stock E	Microelementos					250.00		Este es un Stock compuesto por varios reactivos en muy bajas concentraciones, por lo que primero deben prepararse por separado			5	2.5
		Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0500 g/L			0.0125 g	1.	Pesar 0,1g y disolver en 100ml H ₂ O	0.0003			
								2.	Tomar 10 ml de esta solución				
								3.	Disolverlos en 200ml del stock E				
								4.	Descartar los 90 ml restantes				
		Cloruro de cobalto	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0050 g/L			0.0013 g	1.	Pesar 0.1g y disolver en 100ml H ₂ O	0.000025			
								2.	Tomar 1 ml de esta solución				
								3.	Disolver en 200ml del stock E				
								4.	Descartar los 99 ml restantes				
		Ioduro de Potasio	KI	0.1660 g/L			0.0415 g	Disolver con H ₂ O directamente en frasco de stock E		0.0008			
		Acido Borico	H ₃ BO ₃	1.2300 g/L			0.3075 g	Disolver con H ₂ O directamente en el frasco de stock E		0.0062			
								CORROSIVO, disolver inmediatamente.					
								PELIGROSO al contacto con la Piel					

"Continuación anexo 1..."

6	Stock F	Solución de sulfatos				250.00			Stock compuesto por varios reactivos que primero deben prepararse por separado		5	2.5
		Sulfato de Manganeso Monohidratado	MnSO ₄ ·4H ₂ O	3.3800 g/L			0.8450 g		Disolver en H ₂ O directamente en el frasco de stock F	0.0169		
		Sulfato de Magnesio Heptahidratado	MgSO ₄ · 7H ₂ O	74.0000 g/L			18.5000 g		Disolver en H ₂ O directamente en el frasco de stock F	0.3700		
		Sulfato de Zinc Heptahidratado	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.7250 g/L			0.4313 g		Disolver en H ₂ O directamente en el frasco de stock F	0.0086		
		Sulfato de Cobre Pentahidratado	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0050 g/L			0.0013 g	1.	Pesar 0.1g y disolver en 100mL H ₂ O	0.0000		
								2.	Tomar 1 ml de esta solución			
								3.	Disolver en 200mL del stock			
								4.	Descartar los 99 ml restantes			
7	Stock G	Agente quelante	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	1.8650 g/L		500.00	0.9325 g	1.	Disolver el EDTA en 200 mL de agua destilada, esperar 20 min.	0.0373	20	10
		Sulfato ferroso hepta hidratado	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.3900 g/L			0.6950 g	2.	Calentar la solución hasta antes de hervir	0.0276		
								3.	Agregar el FeSO ₄ lentamente hasta obtener una solución amarillo claro			
								4.	Almacenar en frasco oscuro y en refrigeración (4°C)			
Vitaminas												
8		Tiamina - HCl		1000.00 mg/L		100.00	0.1000 g		Disolver en agua destilada	0.0004	0.4	0.4
Fuente de carbono												
9		Sacarosa o sucrosa		3.00 %						30.0000		
Fitoreguladores												
10		Bencil amino purina		1000.00 mg/L		100.00	0.1000 g		Agregar NaOH 1N hasta disolver completamente, luego agregar agua destilada esteril hasta enrasar a 100 mL. Guardar en	0.0030	3	3
Aditivos orgánicos complejos												
11		Endospermo líquido de coco		10.00 %							100	100
Esterilizador químico												
12		G-1								0.1140		
pH = 5,7												

Medio N° 01: Establecido por Delgado, H. y Alverca, W. en el laboratorio de biotecnología vegetal, EEA "El Porvenir" - INIA; basado en Murashige & Skoog (1962).

Anexo 2: Componentes del medio de cultivo para la fase de multiplicación.

ITEM	Stock	Producto	Fórmula	Concentrac. Stock		Vol. de Stock a preparar (mL)	Pesar		Preparacion	Concentración final en medio de cultivo (g/L)	Cantidad de Stock /L de MS total (en ml)	Cantidad de Stock /L de MS 1/2 (en ml)	
				Cant.	Unid		Cantidad	Unid.					
Macro y micro nutrientes													
1	Stock A	Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	82.50 g/L		500.00	41.2500 g		Disolver en agua destilada y enrazar a 500 mL. CORROSIVO, no pesar en papel aluminio	1.6500	20	10	
2	Stock B	Nitrato de Potasio	KNO ₃	95.00 g/L		500.00	47.5000 g		Disolver en agua destilada y enrazar a 500 mL	1.9000	20	10	
3	Stock C	Cloruro de Calcio dihidratado	CaCl ₂ ·2H ₂ O	88.00 g/L		250.00	22.0000 g		Disolver en agua destilada y enrazar a 250 mL	0.4400	5	2.5	
4	Stock D	Fosfato de Potasio monobasico	KH ₂ PO ₄	34.00 g/L		250.00	8.5000 g		Disolver en agua destilada y enrazar a 250 mL	0.1700	5	2.5	
5	Stock E	Microelementos					250.00			Este es un Stock compuesto por varios reactivos en muy bajas concentraciones, por lo que primero deben prepararse por separado		5	2.5
		Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0500 g/L		0.0125 g		1.	Pesar 0,1g y disolver en 100ml H ₂ O	0.0003			
								2.	Tomar 10 ml de esta solución				
								3.	Disolverlos en 200ml del stock E				
								4.	Descartar los 90 ml restantes				
		Cloruro de cobalto	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0050 g/L		0.0013 g		1.	Pesar 0.1g y disolver en 100ml H ₂ O	0.000025			
								2.	Tomar 1 ml de esta solución				
								3.	Disolver en 200ml del stock E				
								4.	Descartar los 99 ml restantes				
		Ioduro de Potasio	KI	0.1680 g/L		0.0415 g		Disolver con H ₂ O directamente en frasco de stock E	0.0008				
Acido Borico	H ₃ BO ₃	1.2300 g/L		0.3075 g		Disolver con H ₂ O directamente en el frasco de stock E CORROSIVO, disolver inmediatamente. PELIGROSO al contacto con la Piel	0.0062						

"Continuación anexo 2..."

6	Stock F	Solución de sulfatos				250.00			Stock compuesto por varios reactivos que primero deben prepararse por separado		5	2.5
		Sulfato de Manganeso Monohidratado	MnSO ₄ · 4H ₂ O	3.3800 g/L			0.8450 g		Disolver en H ₂ O directamente en el frasco de stock F	0.0169		
		Sulfato de Magnesio Heptahidratado	MgSO ₄ · 7H ₂ O	74.0000 g/L			18.5000 g		Disolver en H ₂ O directamente en el frasco de stock F	0.3700		
		Sulfato de Zinc Heptahidratado	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.7250 g/L			0.4313 g		Disolver en H ₂ O directamente en el frasco de stock F	0.0086		
		Sulfato de Cobre Pentahidratado	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0050 g/L			0.0013 g	1.	Pesar 0.1g y disolver en 100mL H ₂ O	0.0000		
								2.	Tomar 1 ml de esta solución			
								3.	Disolver en 200mL del stock			
								4.	Descartar los 99 ml restantes			
7	Stock G	Agente quelante	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	1.8650 g/L		500.00	0.9325 g	1.	Disolver el EDTA en 200 mL de agua destilada, esperar 20 min.	0.0373	20	10
		Sulfato ferroso heptahidratado	FeSO ₄ · 7H ₂ O	1.3900 g/L			0.6950 g	2.	Calentar la solución hasta antes de hervir	0.0278		
								3.	Agregar el FeSO ₄ lentamente hasta obtener una solución amarillo claro			
								4.	Almacenar en frasco oscuro y en refrigeración (4°C)			
Vitaminas												
8		Tiamina - HCl		1000.00 mg/L		100.00	0.1000 g		Disolver en agua destilada	0.0004	0.4	0.4
9		Ácido Nicotínico		1000.00 mg/L		100.00	0.1000 g		Disolver en agua destilada	0.0005	0.5	0.5
Fuente de carbono												
10		Sacarosa o sucrosa		3.00 %						30.0000		
Fitoreguladores												
11		Bencil amino purina		1000.00 mg/L		100.00	0.1000 g		Agregar NaOH 1N hasta disolver completamente, luego agregar agua destilada estéril hasta enraizar a 100 mL. Guardar en refrigeración.	0.0020	2	2
12		Ácido Naftalenacético		1000.00 mg/L		100.00	0.1000 g		Agregar NaOH 1N hasta disolver completamente, luego agregar agua destilada estéril hasta enraizar a 100 mL. Guardar en refrigeración.	0.0003	0.3	0.3
pH = 5,7												

Medio N° 02: Establecido por Delgado, H. y Alverca, W. en el laboratorio de biotecnología vegetal, EEA "El Porvenir" - INIA; basado en Murashige & Skoog (1962).

Anexo 3: Componentes del medio de cultivo para la fase de multiplicación (BIT).

ITEM	Stock	Producto	Fórmula	Concentrac. Stock		Vol. de Stock a preparar (mL)	Pesar		Preparacion	Concentración final en medio de cultivo (g/L)	Cantidad de Stock /L de MS total (en ml)	Cantidad de Stock /L de MS 1/2 (en ml)
				Cant.	Unid		Cantidad	Unid.				
Macro y micro nutrientes												
1	Stock A	Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	82.50 g/L		500.00	41.2500 g		Disolver en agua destilada y enrazar a 500 mL. CORROSIVO, no pesar en papel aluminio	1.6500	20	10
2	Stock B	Nitrato de Potasio	KNO ₃	95.00 g/L		500.00	47.5000 g		Disolver en agua destilada y enrazar a 500 mL	1.9000	20	10
3	Stock C	Cloruro de Calcio dihidratado	CaCl ₂ ·2H ₂ O	88.00 g/L		250.00	22.0000 g		Disolver en agua destilada y enrazar a 250 mL	0.4400	5	2.5
4	Stock D	Fosfato de Potasio monobasico	KH ₂ PO ₄	34.00 g/L		250.00	8.5000 g		Disolver en agua destilada y enrazar a 250 mL	0.1700	5	2.5
5	Stock E	Microelementos					250.00		Este es un Stock compuesto por varios reactivos en muy bajas concentraciones, por lo que primero deben prepararse por separado		5	2.5
		Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₂ ·2H ₂ O	0.0500 g/L		0.0125 g	1.	Pesar 0,1g y disolver en 100ml H ₂ O	0.0003			
							2.	Tomar 10 ml de esta solución				
							3.	Disolverlos en 200ml del stock E				
							4.	Descartar los 90 ml restantes				
		Cloruro de cobalto	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0050 g/L		0.0013 g	1.	Pesar 0.1g y disolver en 100ml H ₂ O	0.000025			
							2.	Tomar 1 ml de esta solución				
							3.	Disolver en 200ml del stock E				
							4.	Descartar los 99 ml restantes				
		Ioduro de Potasio	KI	0.1660 g/L		0.0415 g		Disolver con H ₂ O directamente en frasco de stock E	0.0008			
		Acido Borico	H ₃ BO ₃	1.2300 g/L		0.3075 g		Disolver con H ₂ O directamente en el frasco de stock E CORROSIVO, disolver inmediatamente. PELIGROSO al contacto con la Piel	0.0062			

"Continuación anexo 3..."

6	Stock F	Solución de sulfatos			250.00		Stock compuesto por varios reactivos que primero deben prepararse por separado		5	2.5
		Sulfato de Manganeso Monohidrato	MnSO ₄ ·4H ₂ O	3.3800 g/L		0.8450 g	Disolver en H ₂ O directamente en el frasco de stock F	0.0169		
		Sulfato de Magnesio Heptahidratado	MgSO ₄ ·7H ₂ O	74.0000 g/L		18.5000 g	Disolver en H ₂ O directamente en el frasco de stock F	0.3700		
		Sulfato de Zinc Heptahidratado	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.7250 g/L		0.4313 g	Disolver en H ₂ O directamente en el frasco de stock F	0.0086		
		Sulfato de Cobre Pentahidratado	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0050 g/L		0.0013 g	1. Pesar 0.1g y disolver en 100mL H ₂ O 2. Tomar 1 ml de esta solución 3. Disolver en 200mL del stock 4. Descartar los 99 ml restantes	0.0000		
7	Stock G	Agente quelante	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	1.8850 g/L	500.00	0.9325 g	1. Disolver el EDTA en 200 mL de agua destilada, esperar 20 min.	0.0373	20	10
		Sulfato ferroso hepta hidratado	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.3900 g/L		0.6950 g	2. Calentar la solución hasta antes de hervir 3. Agregar el FeSO ₄ lentamente hasta obtener una solución amarillo claro 4. Almacenar en frasco oscuro y en refrigeración (4°C)	0.0278		
Vitaminas										
8		Tiamina - HCl		1000.00 mg/L	100.00	0.1000 g	Disolver en agua destilada	0.0004	0.4	0.4
9		Ácido Nicotínico		1000.00 mg/L	100.00	0.1000 g	Disolver en agua destilada	0.0005	0.5	0.5
fuentes de carbono										
10		Sacarosa o sucrosa		3.00 %				30.0000		
Fitoreguladores										
11		Bencil amino purina		1000.00 mg/L	100.00	0.1000 g	Agregar NaOH 1N hasta disolver completamente, luego agregar agua destilada esteril hasta enraizar a 100 mL. Guardar en refrigeración.	0.0021	2,1	2,1
12		Ácido Naftalenacético		1000.00 mg/L	100.00	0.1000 g	Agregar NaOH 1N hasta disolver completamente, luego agregar agua destilada esteril hasta enraizar a 100 mL. Guardar en refrigeración.	0.0003	0,3	0,3
Esterilizador químico										
13		G-1						0.1140		
pH = 5,8										

Anexo 4: Componentes del medio de cultivo para la fase de elongación (BIT).

ITEM	Stock	Producto	Fórmula	Concentrac. Stock		Vol. de Stock a preparar (mL)	Pesar		Preparacion	Concentración final en medio de cultivo (g/L)	Cantidad de Stock /L de MS total (en ml)	Cantidad de Stock /L de MS 1/2 (en ml)
				Cant.	Unid		Cantidad	Unid.				
Macro y micro nutrientes												
1	Stock A	Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	82.50 g/L		500.00	41.2500 g		Disolver en agua destilada y enrazar a 500 mL. CORROSIVO, no pesar en papel aluminio	1.8500	20	10
2	Stock B	Nitrato de Potasio	KNO ₃	95.00 g/L		500.00	47.5000 g		Disolver en agua destilada y enrazar a 500 mL	1.9000	20	10
3	Stock C	Cloruro de Calcio dihidratado	CaCl ₂ ·2H ₂ O	88.00 g/L		250.00	22.0000 g		Disolver en agua destilada y enrazar a 250 mL	0.4400	5	2.5
4	Stock D	Fosfato de Pctasio monobasico	KH ₂ PO ₄	34.00 g/L		250.00	8.5000 g		Disolver en agua destilada y enrazar a 250 mL	0.1700	5	2.5
5	Stock E	Microelementos					250.00		Este es un Stock compuesto por varios reactivos en muy bajas concentraciones, por lo que primero deben prepararse por separado		5	2.5
		Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0500 g/L			0.0125 g	1.	Pesar 0,1g y disolver en 100ml H ₂ O	0.0003		
								2.	Tomar 10 ml de esta solución			
								3.	Disolverlos en 200ml del stock E			
								4.	Descartar los 90 ml restantes			
		Cloruro de cobalto	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0050 g/L			0.0013 g	1.	Pesar 0.1g y disolver en 100ml H ₂ O	0.000025		
								2.	Tomar 1 ml de esta solución			
								3.	Disolver en 200ml del stock E			
								4.	Descartar los 99 ml restantes			
		Ioduro de Potasio	KI	0.1660 g/L			0.0415 g		Disolver con H ₂ O directamente en frasco de stock E	0.0008		
Acido Borico	H ₃ BO ₃	1.2300 g/L			0.3075 g		Disolver con H ₂ O directamente en el frasco de stock E CORROSIVO, disolver inmediatamente. PELIGROSO al contacto con la Piel	0.0062				

"Continuación anexo 4..."

6	Stock F	Solución de sulfatos			250.00		Stock compuesto por varios reactivos que primero deben prepararse por separado		5	2.5
		Sulfato de Manganeso Monohidrato	MnSO ₄ ·4H ₂ O	3.3800 g/L		0.8450 g	Disolver en H ₂ O directamente en el frasco de stock F	0.0169		
		Sulfato de Magnesio Heptahidratado	MgSO ₄ · 7H ₂ O	74.0000 g/L		18.5000 g	Disolver en H ₂ O directamente en el frasco de stock F	0.3700		
		Sulfato de Zinc Heptahidratado	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.7250 g/L		0.4313 g	Disolver en H ₂ O directamente en el frasco de stock F	0.0088		
		Sulfato de Cobre Pentahidratado	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0050 g/L		0.0013 g	1. Pesar 0.1g y disolver en 100mL H ₂ O 2. Tomar 1 ml de esta solución 3. Disolver en 200mL del stock 4. Descartar los 99 ml restantes	0.0000		
7	Stock G	Agente quelante	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	1.8850 g/L	500.00	0.9325 g	1. Disolver el EDTA en 200 mL de agua destilada, esperar 20 min.	0.0373	20	10
		Sulfato ferroso hepta hidratado	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.3900 g/L		0.6950 g	2. Calentar la solución hasta antes de hervir 3. Agregar el FeSO ₄ lentamente hasta obtener una solución amarillo claro 4. Almacenar en frasco oscuro y en refrigeración (4°C)	0.0278		
Vitaminas										
8		Tiamina - HCl		1000.00 mg/L	100.00	0.1000 g	Disolver en agua destilada	0.0004	0.4	0.4
9		Acido Nicotínico		1000.00 mg/L	100.00	0.1000 g	Disolver en agua destilada	0.0005	0.5	0.5
Fuente de carbono										
10		Sacarosa o sucrosa		3.00 %				30.0000		
Fitoreguladores										
11		Bencil amino purina		1000.00 mg/L	100.00	0.1000 g	Agregar NaOH 1N hasta disolver completamente, luego agregar agua destilada estéril hasta enrasar a 100 mL. Guardar en refrigeración.	0.0021	2,1	2,1
12		Ácido Giberélico		1000.00 mg/L	100.00	0.1000 g	Agregar Etanol hasta disolver completamente, luego agregar agua destilada estéril hasta enrasar a 100 mL. Guardar en refrigeración y en oscuridad	0.0010	1	1
pH = 5,8										

Medio N° 04: Establecido por ESCALONA et al. 1999.

Anexo 5: Componentes del medio de cultivo para la fase de enraizamiento (BIT).

ITEM	Stock	Producto	Fórmula	Concentrac. Stock		Vol. de Stock a preparar (mL)	Pesar		Preparacion	Concentración final en medio de cultivo (g/L)	Cantidad de Stock /L de MS total (en ml)	Cantidad de Stock /L de MS 1/2 (en ml)
				Cant.	Unid.		Cant.	Unid.				
Macro y micro nutrientes												
1	Stock A	Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	82.50 g/L		500.00	41.2500 g		Disolver en agua destilada y enrazar a 500 mL. CORROSIVO, no pesar en papel aluminio	1.6500	20	10
2	Stock B	Nitrato de Potasio	KNO ₃	95.00 g/L		500.00	47.5000 g		Disolver en agua destilada y enrazar a 500 mL	1.9000	20	10
3	Stock C	Cloruro de Calcio dihidratado	CaCl ₂ ·2H ₂ O	88.00 g/L		250.00	22.0000 g		Disolver en agua destilada y enrazar a 250 mL	0.4400	5	2.5
4	Stock D	Fosfato de Potasio monobasico	KH ₂ PO ₄	34.00 g/L		250.00	8.5000 g		Disolver en agua destilada y enrazar a 250 mL	0.1700	5	2.5
5	Stock E	Microelementos					250.00		Este es un Stock compuesto por varios reactivos en muy bajas concentraciones, por lo que primero deben prepararse por separado		5	2.5
		Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0500 g/L			0.0125 g	1.	Pesar 0,1g y disolver en 100ml H ₂ O	0.0003		
								2.	Tomar 10 ml de esta solución			
								3.	Disolverlos en 200ml del stock E			
								4.	Descartar los 90 ml restantes			
		Cloruro de cobalto	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0050 g/L			0.0013 g	1.	Pesar 0.1g y disolver en 100ml H ₂ O	0.000025		
								2.	Tomar 1 ml de esta solución			
								3.	Disolver en 200ml del stock E			
								4.	Descartar los 99 ml restantes			
		Ioduro de Potasio	KI	0.1660 g/L			0.0415 g		Disolver con H ₂ O directamente en frasco de stock E	0.0008		
		Acido Borico	H ₃ BO ₃	1.2300 g/L			0.3075 g		Disolver con H ₂ O directamente en el frasco de stock E CORROSIVO, disolver inmediatamente. PELIGROSO al contacto con la Piel	0.0062		

"Continuación anexo 5..."

6	Stock F	Solución de sulfatos			250.00		Stock compuesto por varios reactivos que primero deben prepararse por separado		5	2.5
		Sulfato de Manganeso Monohidrato	MnSO ₄ ·4H ₂ O	3.3800 g/L		0.8450 g	Disolver en H ₂ O directamente en el frasco de stock F	0.0169		
		Sulfato de Magnesio Heptahidratado	MgSO ₄ ·7H ₂ O	74.0000 g/L		18.5000 g	Disolver en H ₂ O directamente en el frasco de stock F	0.3700		
		Sulfato de Zinc Heptahidratado	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.7250 g/L		0.4313 g	Disolver en H ₂ O directamente en el frasco de stock F	0.0086		
		Sulfato de Cobre Pentahidratado	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0050 g/L		0.0013 g	1. Pesar 0.1g y disolver en 100mL H ₂ O	0.0000		
							2. Tomar 1 ml de esta solución			
							3. Disolver en 200mL del stock			
							4. Descartar los 99 ml restantes			
7	Stock G	Agente quelante	Na ₂ EDTA 2H ₂ O	1.8650 g/L	500.00	0.9325 g	1. Disolver el EDTA en 200 mL de agua destilada, esperar 20 min.	0.0373	20	10
		Sulfato ferroso hepta hidratado	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.3900 g/L		0.6950 g	2. Calentar la solución hasta antes de hervir	0.0278		
							3. Agregar el FeSO ₄ lentamente hasta obtener una solución amarillo claro			
							4. Almacenar en frasco oscuro y en refrigeración (4°C)			
Vitaminas										
8		Tiamina - HCl		1000.00 mg/L	100.00	0.1000 g	Disolver en agua destilada	0.0004	0.4	0.4
9		Acido Nicotínico		1000.00 mg/L	100.00	0.1000 g	Disolver en agua destilada	0.0005	0.5	0.5
fuentes de carbono										
10		Sacarosa o sucrosa		3.00 %				30.0000		
Aditivos orgánicos complejos										
11		Endospermo líquido de coco		20.00 %					200 ml	200 ml
pH = 5,8										

Medio N° 05: Establecido por ESCALONA et al. 1999.

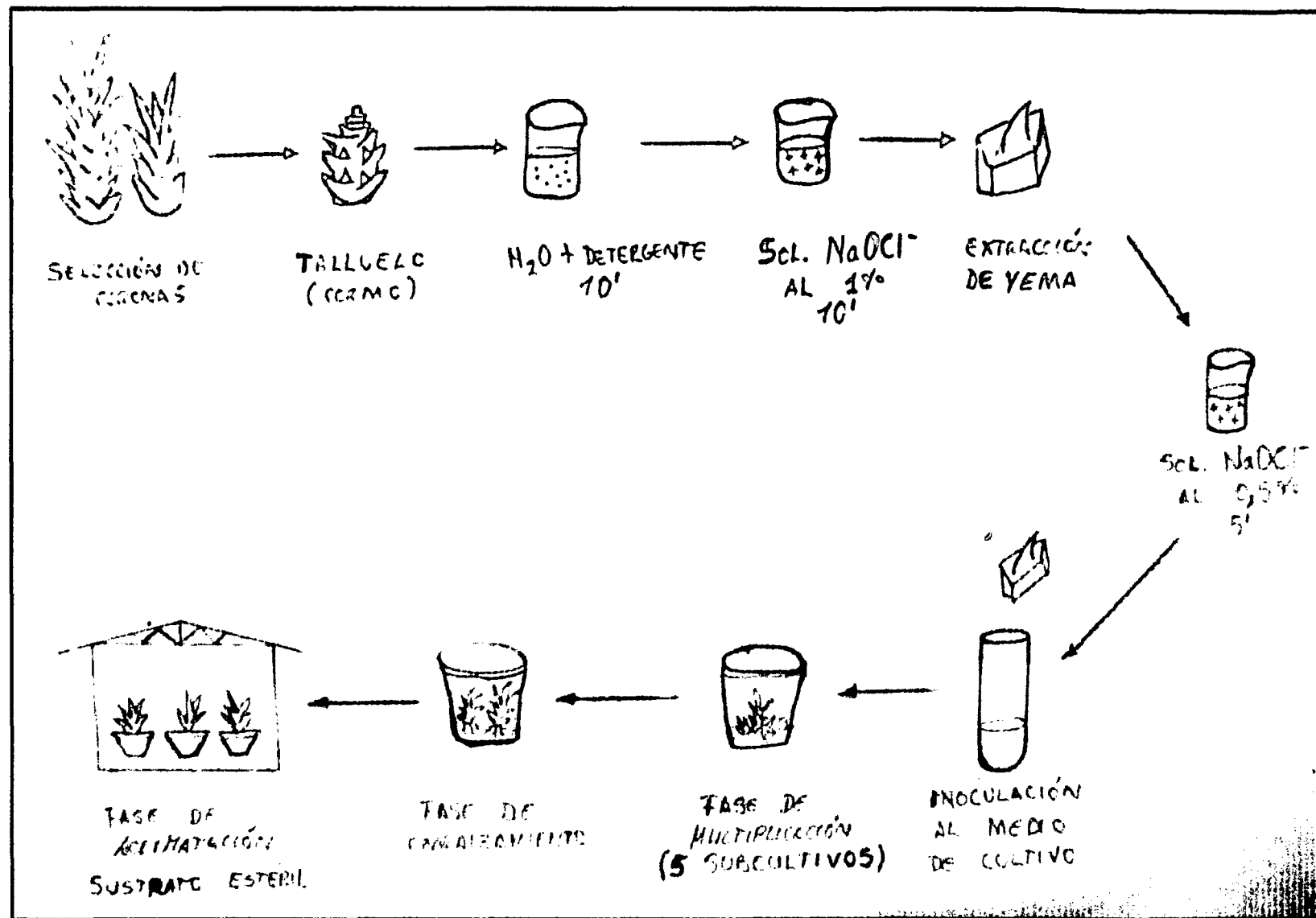
Anexo 6: Condiciones de cultivo para la micropropagación de plántulas de
***Ananas comosus* (L.) Merr. cultivar MD-2 "Golden"**

Date Time	Temperatura del área de incubación (°C)	H.R. del área de incubación (%)	H.R. dentro del BIT (%)	Intensidad luminosa (lux/m ²)
00:30	24.65	32.79	95.46	11.5264
01:30	24.03	31.23	96.12	11.0636
02:30	24.35	31.82	98.44	2074.7639
03:30	24.56	30.41	100.00	2223.7639
04:30	24.17	30.57	100.00	2363.9151
05:30	24.11	31.12	100.00	2374.7639
06:30	24.85	32.15	100.00	2313.6429
07:30	24.30	29.62	100.00	2357.7792
08:30	24.85	26.95	100.00	2489.2936
09:30	24.80	24.47	100.00	2415.0557
10:30	24.41	23.33	98.68	2499.6564
11:30	24.21	22.15	98.11	2515.6123
12:30	25.01	22.33	97.81	2551.9616
13:30	25.47	21.62	96.30	2620.2514
14:30	26.3	21.44	95.62	2710.6429
15:30	27.23	22.62	94.21	2407.0344
16:30	26.51	23.87	93.20	2385.1861
17:30	26.64	25.26	93.62	2105.6429
18:30	26.89	27.40	92.21	11.1276
19:30	27.29	28.55	91.40	12.0860
20:30	28.35	31.85	90.20	10.8257
21:30	29.45	32.11	90.65	10.1543
22:30	27.08	32.61	91.84	9.5012
23:30	25.46	33.33	93.20	10.2136

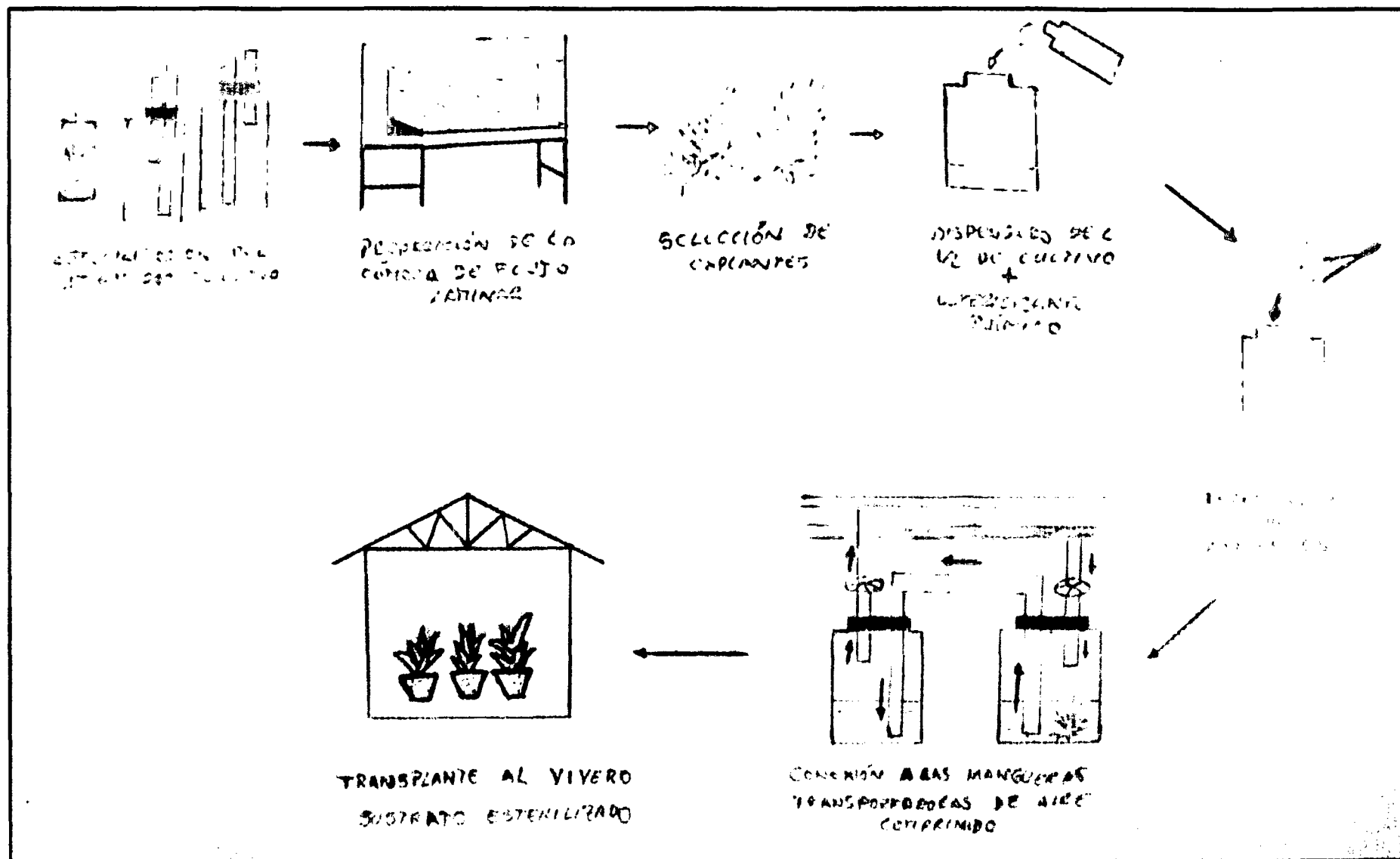


Foto 35: Enraizamiento *ex vitro* de las plantas de piña obtenidas mediante SIT

Anexo 7: Esquema de producción de la piña mediante la propagación convencional *in vitro*



Anexo 8: Esquema de producción de la piña mediante Biorreactores de Inmersión Temporal



Anexo 9: Costo de producción para *Ananas comosus* (L.) Merr. cultivar MD-2

“Golden”, mediante SIT

ACTIVIDADES	Unidad	Cantidad	Costo unit.	TOTAL
Preparación de medios de cultivo (insumos)				
Sales MS	L	11.00	5.00	55.00
Sacarosa	kg	2.30	2.00	4.60
Tiamina	g	0.03	20.00	0.66
Acido nicotínico	g	0.03	20.00	0.66
ANA	g	1.30	25.00	32.50
BAP	g	1.30	30.00	39.00
AG3	g	1.30	25.00	32.50
Agua destilada	L	45.00	0.50	22.50
Agua de coco	L	2.60	0.50	1.30
Sub total				188.72
Equipos				
Autoclave	h	12.00	0.68	8.10
Cámara de flujo de aire estéril	h	20.00	0.03	0.60
Compresora de aire	h	240.00	0.05	12.00
Tubos fluorescentes	h	1920.00	0.01	9.60
Refrigeradora	h	15.00	0.30	4.50
Sub total				34.80
Insumos para transferencias				
Alcohol 96°	L	2.00	6.00	12.00
Cinta selladora	Caja	1.00	10.00	10.00
Papel de aluminio	Caja	0.50	7.50	3.75
Algodón	Rollo	0.20	20.00	4.00
Detergente	kg	0.25	12.00	3.00
Lejía	L	0.50	5.00	2.50
Mascarillas	Unidad	4.00	0.80	3.20
Sub total				38.45
Materiales para la preparación del BIT				
Botellas de plástico	Unidad	18.00	3.00	54.00
Manguera	m.	13.00	0.50	6.50
Tubos de aluminio	m.	4.00	3.00	12.00
Anillos planos	Unidad	72.00	0.05	3.60
Pegamento	Unidad	1.00	6.00	6.00
Filtros	Unidad	18.00	15.00	270.00
Sub total				352.10
TOTAL				614.07
MANO DE OBRA	Unidad	Cantidad	Costo unit	Costo total
Preparación de Medio de Cultivo	Jornal	1.00	30.00	30.00
Siembras y Transferencias	Jornal	2.00	30.00	60.00
Aclimatación	Jornal	1.00	30.00	30.00
TOTAL DE MANO DE OBRA				120.00
COSTO DE PRODUCCIÓN PARA 2300 PLANTAS				SI. 734.07
COSTO UNITARIO POR PLANTA				SI. 0.32

Anexo 10: Costo de producción para *Ananas comosus* (L.) Merr. cultivar MD-2

“Golden”, mediante procedimientos convencionales

ACTIVIDADES	Unidad	Cantidad	Costo unit.	TOTAL
Preparación de medios de cultivo (insumos)				
Sales MS	L	18.00	5.00	90.00
Sacarosa	kg	6.00	2.00	12.00
Tiamina	g	0.10	20.00	2.00
Acido nicotínico	g	0.1	20.00	2.00
ANA	g	2.00	25.00	50.00
BAP	g	2.00	30.00	60.00
AG3	g	2.00	25.00	50.00
Agua destilada	L	75.00	0.50	37.50
Agua de coco	L	6.00	0.50	3.00
Sub total				306.50
Equipos				
Autoclave	h	24.00	0.68	16.20
Cámara de flujo de aire estéril	h	80.00	0.03	2.40
Tubos fluorescentes	h	6000.00	0.01	30.00
Refrigeradora	h	20.00	0.30	6.00
Sub total				54.60
Insumos para transferencias				
Alcohol 96°	L	6.00	6.00	36.00
Cinta selladora	Caja	4.00	10.00	40.00
Papel de aluminio	Caja	2.00	7.50	15.00
Algodón	Rollo	1.00	20.00	20.00
Detergente	kg	1.00	12.00	12.00
Lejía	L	1.50	5.00	7.50
Mascarillas	Unidad	10.00	0.80	8.00
Pote de plástico	Unidad	500.00	0.50	250.00
Sub total				250.00
TOTAL				611.10
MANO DE OBRA	Unidad	Cantidad	Costo unit	Costo total
Preparación de Medio de Cultivo	Jornal	6.00	30.00	180.00
Siembras y Transferencias	Jornal	6.00	30.00	180.00
Acimatación	Jornal	1.00	30.00	30.00
TOTAL MANO DE OBRA				390.00
COSTO DE PRODUCCIÓN PARA 2300 PLANTAS				S/. 1,001.10
COSTO UNITARIO POR PLANTA				S/. 0.44

Anexo 11: Costo de instalación de un sistema de inmersión temporal

EQUIPOS	Unidad	Cantidad	Costo unitario (S/.)	TOTAL (S/.)
Compresora de aire	Unidad	1	1,200	1,200
Filtros hidrófobos de 0,2 µm	Unidad	18	10	180
Tubo PVC ½" 3 m	Unidad	6	5.20	31.20
Válvula solenoide automatizada	Unidad	2	120	240
Temporizador digital	Unidad	2	64	128
Botellas de plástico 5.L	Unidad	18	3	54
Manguera de plástico	m	10	1.50	15
Aire acondicionado split	Unidad	1	1,400	1,400
Termohigrómetro digital	Unidad	1	130	130
TOTAL				3,378

*Se estima el costo de mano de obra para la instalación, según el área teniendo como referencia un valor de S/. 15,000.00